

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

Am

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/40668 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12,
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Oktober 2001 (30.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): APOTECH RESEARCH & DEVELOPMENT LTD. [CH/CH]; 84, Rue de Rhone, CH-1204 Genf (CH).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): TSCHOPP, Jürg [CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges (CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004 Lausanne (CH).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch, Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München (DE).

(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMATIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.

WO 02/40668 A2

**Proteine und den Proteinen zugrundeliegende DNA-Sequenzen
mit Funktion bei Entzündungsereignissen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für
mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren,
die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die
mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind,
aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen,
10 Antikörper gegen die vorgenannten Genprodukte, Verfahren
zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten
Genprodukte und die Verwendung der DNA-Sequenzen oder der
Genprodukte zur Behandlung von Entzündungsereignissen.
- 15 Proteine weisen einen modularen Aufbau auf, wobei die
einzelnen Abschnitte von Proteinen strukturell und ggf.
funktionell selbständig sind. Diese Abschnitte werden
Domänen genannt. Proteine mit modularem Aufbau treten
beispielsweise bei Proteinen der apoptotischen
20 Signaltransduktionskette auf (Aravind et al. (1999) TIBS,
24, 47-53; Hofmann (1999) Cell. Mol. Life. Sci., 55,
1113-28). Für die Klasse der apoptotischen
Signaltransduktionsproteine wären drei Familien von
Domänen zu nennen, nämlich die Familie der Todesdomänen

- (DD), die Familie der Todeseffektordomänen (DED) und die Familie der Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), die alle entfernt miteinander verwandt sind und auch alle einer Superfamilie angehören, die typischerweise in ihrer 3-dimensionalen Struktur ein Bündel von sechs Helices ("six helix bundle") bildet. Zu jenen Proteinen, die eine Todesdomäne, Todeseffektordomäne und/oder eine CARD-Domäne aufweisen, gehören beispielsweise die Proteine FLIP, CARDIAK-RIP2, ARC, Bcl10, DEDD, wie in den Veröffentlichungen von Irmeler et al., 1997, Nature, 388, 190-195; Koseki et al. 1998, Proct. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5156-60; McCarthy et al. 1998, J. Biol. Chem. 273, 16968-16975; Stegh, et al., 1998, EMBO J., 17, 5974-86; Thome et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8 gezeigt.
- Während also zahlreiche Proteine, die Domänen der strukturellen Superfamilie (Bündel aus sechs Helices) aufweisen, in intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse verwickelt sind, insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit zur Assoziierung mit vor- bzw. in der Signaltransduktion nachgeschalteten Proteinen, sind die an der Entzündungsreaktion beteiligten Proteine, ebenso wie die Form der Signalübertragung bei inflammatorischen Reaktionen weitgehend unbekannt.
- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es einerseits, solche Proteine (mit ihren Aminosäuresequenzen) und ggf. den zugrundeliegenden DNA-Sequenzen zu identifizieren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, oder aus anderem Zusammenhang bekannten Proteinen eine Funktion in der Entzündungsreaktionskaskade zuzuweisen und andererseits, durch Bestimmung der Signaltransduktionsmechanismen, Stoffe zur Behandlung inflammatorischer Reaktionen zur Verfügung zu stellen.
- Zur Lösung dieser Aufgabe haben die Erfinder zunächst festgestellt, daß PYD-Domänen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Weitergabe eines inflammatorischen Signals spielen. Erfindungsgemäß wurde

- festgestellt, daß die Domäne PYD ebenfalls die Struktur des Bündels aus 6 Helices aufweist und daß sie in ihrem Interaktionspotential mit den insoweit strukturell verwandten Domänen DED, DD oder CARD vergleichbar ist.
- 5 Damit wird erfindungsgemäß eine vierte Familie von "Sechs-Helix-Bündel"-Domänen (hier als Domäne "PYD" bezeichnet), die als Bestandteil von nativen Proteinen auftritt, zur Verfügung gestellt.
- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codieren, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele. Insbesondere sind alle DNA-Sequenzen mit umfaßt, die mit den erfindungsgemäßen
- 15 DNA-Sequenzen hybridisieren, einschließlich der jeweils im Doppelstrang komplementären Sequenzen (Anspruch 1).

In Hinblick auf die Hybridisierungsbedingungen wird im einzelnen offenbart, dass homologe oder sequenzverwandte DNA-Sequenzen aus allen Säugerspezies, einschließlich

20 Mensch, nach gängigen Verfahren durch Homologie-Screening durch Hybridisierung mit einer Probe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Teilen davon isoliert werden. Unter funktionellen Äquivalenten sind auch Homologe der nativen PYD-Domänen enthaltenden

25 Sequenzen, bspw. der in Figur 1 dargestellten Sequenzen, beispielsweise ihre Homologen aus anderen Mammalia, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nicht-codierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

- 30 Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche, die auf dem Fachmann bekannte Weise ermittelt werden können, verwendet. In jedem Fall wird die Verwendung und Funktion von mindestens 15, vorzugsweise mindestens 20 AS langen Nukleotidabschnitten
- 35 (auch als solche offenbart) der in Figur enthaltenen Nukleotidsequenzen als Primer für PCR-Reaktionen oder als

Oligonukleotide auf DNA-Chips offenbart. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure-Sequenz (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) bzw. je nachdem, welche Nukleinsäureart (DNA oder RNA) für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge. Unter Standardbedingungen sind beispielsweise, je nach Nukleinsäure, Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid, wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid, zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise bei Sambrook et al. ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln, beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausübel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John

Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden solche erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen offenbart, für die sich ein Signifikanzniveau von $p < 10^{-2}$ ergibt, wenn die PYD-Domäne einer Ziel-DNA-Sequenz (also einer potentiell erfindungsgemäßen DNA-Sequenz) mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird (Anspruch 2). In Hinblick auf die diesbezügliche experimentelle Vorgehensweise wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem., 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden DNA-Sequenzen offenbart, deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält. Vorteilhafterweise weisen derartige Derivate oder Allele eine Sequenzhomologie von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 90% und noch stärker bevorzugt von mindestens 95% und am stärksten bevorzugt von mindestens 98% mit der vorgenannten Sequenz auf. Auch mit diesen erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisierende DNA-Sequenzen (einschließlich der Sequenzen des komplementären DNA-Stranges) sind mitoffenbart (Anspruch 3).

Bevorzugt sind weiterhin DNA-Sequenzen, die eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthalten (Anspruch

4). Im Zuge der erfindungsgemäßen Feststellungen wurde nämlich herausgefunden, daß erfindungsgemäße DNA-Sequenzen für zahlreiche Proteine (Aminosäuresequenzen) mit einer PYD-Domäne codieren, die insbesondere auch am

5 ggf. pathophysiologischen Inflammationsgeschehen beteiligt sind. Diese DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) sind in Fig. 1 dargestellt. Hierzu gehören, wie in Figur 1 jeweils mit Codierungsnummer dargestellt, die Proteine Pyrin (siehe

10 entsprechende Protein- bzw. cDNA-Sequenzen gemäß Fig. 1, Codierungsnummer 1.2), Pycard (Protein und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.3), Pyc (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.1), NALP1 (Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.4), NALP2 ((alter Name

15 Py7) mit Protein- und einer DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.5), NALP3 ((alter Name PY5) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.6), NALP4 ((alter Name PY6) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.7), NALP5 ((alter Name Py8) mit Proteinsequenz und DNA-

20 Sequenz, Codierungsnummer 1.8), NALP6 ((alter Name PY9) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.9), PY10 (mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.10), NALP7 ((alter Name Py11) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.11),

25 NALP8 ((alter Name Py12) mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.12), NALP9 ((alter Name Py13) mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.13), NALP10 ((alter Name Py14) mit Protein- und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.14), NALP11 ((alter Name

30 Py15) mit Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.15), Py16 ((von der Maus), mit Proteinsequenz und DNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.16), NALP13 ((alter Name Py17), mit Protein- und CDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.17), NALP14 ((alter Name Py18), von der Maus, mit

35 Protein- und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.18), NALP15 ((alter Name Py19) mit Protein- und partieller DNA-

Sequenz, Codierungsnummer 1.19), NALP12 ((alter Name Py20), von der Maus, mit Proteinsequenz und cDNA-Sequenz, Codierungsnummer 1.20). Die vorgenannten Sequenzen sind sämtlich in Figur 1 aufgetragen und dort unter den
5 vorgenannten Bezeichnungen bzw. den Codierungsnummern auffindbar. Die zusammengehörigen, d. h. unter einer Codierungsnummer zusammengefaßten DNA- und Proteinsequenzen sind jeweils durch gepunktete Linien im Fettdruck von der nächsten Einheit getrennt. Figur 1
10 umfaßt 22 durchnummerierte Seiten. Damit handelt es sich bei einem weiteren bevorzugten Gegenstand der vorliegenden Erfindung um DNA-Sequenzen, die für eines der in Figur 1 dargestellten Genprodukte (d.h. für eine der in Figur 1 enthaltenen Aminosäuresequenzen) codieren
15 oder DNA-Sequenzen, die zumindest in einem Abschnitt der Gesamtsequenz für eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen codieren (Anspruch 5).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind
20 Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, bspw. wie zuvor offenbart oder gemäß Ansprüchen 1 bis 5 beansprucht, enthalten (Anspruch 6). Derartige erfindungsgemäße Expressionsvektoren (bspw. Plasmide) enthalten neben mindestens einer erfindungsgemäßen DNA-
25 Sequenz typischerweise auch Promotor-Bereiche und Terminator-Bereiche, ggf. auch Marker-Gene (bspw. Antibiotika-Resistenz-Gene) und/oder Signalsequenzen zum Transport des translatierten Proteins.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert wurden (Anspruch 7). Als geeignete Wirtszellen zur Klonierung oder Exprimierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kommen Prokaryotenhefen
35 oder höhere eukaryotische Zellen in Frage. Bei Prokaryoten sind Gram-negative oder Gram-positive Organismen

ausdrücklich eingeschlossen. Zu nennen ist hier E.coli oder Bazillen. Als bevorzugte Wirtszellen zur Klonierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden die Stämme E.coli 294, E.coli B und E.coli X1776 sowie E.coli W3110
5 offenbart. Bei den Bazillen stehen *Bazillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* oder ähnliche. Wie oben bereits erwähnt, enthalten die Expressionsvektoren typischerweise eine Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Kulturmedium, so werden prokaryotische Zellen eingesetzt
10 werden. Neben Prokaryoten kommen auch eukaryotische Mikroben als Wirtszellen, die mit dem Expressionsvektor transfiziert worden sind, in Frage. So etwa können filamentöse Pilze oder Hefen als geeignete Wirtszellen für die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierende Vektoren
15 eingesetzt werden. Zu nennen ist vor allem *Saccharomyces cerevisiae* oder die gewöhnliche Bäckerhefe (Stinchcomb et al., Nature, 282:39, (1997)).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden jedoch zur
20 Expression von erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen Zellen aus multizellulären Organismen gewählt. Dies geschieht auch vor dem Hintergrund einer möglicherweise erforderlichen Glykosilierung der codierten Proteine. Diese Funktion kann in höheren Eukaryotenzellen - im Vergleich zu
25 Prokaryotenzellen - in geeigneter Weise ausgeführt werden. Im Prinzip ist jede höhere eukaryotische Zellkultur als Wirtszelle verfügbar, wenn auch Zellen von Säugern, beispielsweise Affen, Ratten, Hamstern oder Menschen, ganz besonders bevorzugt sind. Dem Fachmann ist eine Vielzahl
30 von etablierten Zelllinien bekannt. In einer keineswegs abschließenden Aufzählung werden die folgenden Zelllinien genannt: 293T (Embryonennierenzelllinie), (Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1997)), BHK (Babyhamsternierenzellen), CHO (Zellen aus den
35 Hamsterovarien), (Urlaub und Chasin, P. N. A. S. (USA)

77:4216, (1980)), HeLa (humane Cervixkarzinomzellen) und weitere Zelllinien.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind mit Expressions-
vektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen aufwei-
sen, vorzugsweise Zellen des Säugetierimmunsystems, vor
5 allem des humanen Immunsystems, transfiziert (Anspruch 8).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind die
Genprodukte der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen (Anspruch
10 9). Unter Genprodukten versteht man im Sinne dieser
Erfindung sowohl Primärtranskripte, also RNA, vorzugsweise
mRNA, als auch Proteine bzw. Polypeptide, insbesondere in
aufgereinigter Form (Anspruch 10). Diese Proteine weisen
15 erfindungsgemäß mindestens eine PYD-Domäne auf und
regulieren oder transportieren insbesondere
inflammatorische Signale. Bevorzugt ist ein aufgereinigtes
Genprodukt dann, wenn es eine der in Figur 7 angegebenen
Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich
20 aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate
enthält. Zu den erfindungsgemäßen Proteinen gehören aber
auch all jene Proteine, die sich von erfindungsgemäßen
DNA-Derivaten, DNA-Fragmenten oder DNA-Allelen ableiten.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Proteine
chemisch modifiziert sein. So etwa kann eine Schutzgruppe
am N-Terminus vorliegen. Es können Glykosylgruppen an
Hydroxyl- oder Aminogruppen angefügt sein, Lipide
(insbesondere Fettsäuren, bspw. Myristyl- oder
30 Palmitylsäure) können kovalent mit dem erfindungsgemäßen
Protein verbunden sein, ebenso Phosphate oder
Acetylgruppen und ähnliches. Auch beliebige chemische
Substanzen, Verbindungen oder Gruppen können auf einem
beliebigen Syntheseweg an das erfindungsgemäße Protein
35 gebunden sein. Auch zusätzliche Aminosäuren, z.B. in Form
einzelner Aminosäuren oder in Form von Peptiden oder in

Form von Proteindomänen und ähnliches, können mit dem N- und/oder C-Terminus fusioniert sein. Insbesondere sind hier sogenannte Signal- oder "Leader"-Sequenzen am N-Terminus der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz vorliegen, die das Peptid cotranslational oder posttranslational in eine bestimmte Zellorganelle oder in den extrazellulären Raum (bzw. das Kulturmedium) führen. Am N- oder am C-Terminus können auch Aminosäuresequenzen vorliegen, die als Antigen die Bindung der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenz an Antikörper erlauben. Zu nennen ist hier insbesondere das Flag-Peptid, dessen Sequenz im Einbuchstabencode der Aminosäuren lautet: DYKDDDDK oder auch His-Tags (mindestens 5, vorzugsweise mindestens 6 His-Reste). Diese Sequenz hat stark antigene Eigenschaften und erlaubt somit eine schnelle Überprüfung und leichte Reinigung des rekombinanten Proteins. Monoklonale Antikörper, die das Flag-Peptid binden, sind von der Firma Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut erhältlich. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in zahlreichen Exons, die durch Introns voneinander getrennt sind, auf dem Strang des Erbinformationsmoleküls abgelegt sein. Damit gehören auch alle denkbaren SPLICE-Varianten (auf mRNA-Ebene) als Genprodukte zum erfindungsgemäßen Gegenstand. Auch die von diesen verschiedenen SPLICE-Varianten codierten Proteine unterfallen dieser Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper, der ein Epitop auf einem erfindungsgemäßen Genprodukt, insbesondere einem erfindungsgemäßen Protein, erkennt (Anspruch 12). Der Begriff "Antikörper" umfaßt i.S. der vorliegenden Erfindung sowohl polyklonale Antikörper als auch monoklonale Antikörper (Anspruch 13), chimärische Antikörper, anti-idiotypische Antikörper (gerichtet gegen

erfindungsgemäße Antikörper), die alle in gebundener oder löslicher Form vorliegen und ggf. durch "Label" markiert sein können, sowie auch Fragmente der vorgenannten Antikörper. Neben den Fragmenten von erfindungsgemäßen Antikörpern in Alleinstellung können erfindungsgemäße Antikörper auch in rekombinanter Form als Fusionsproteine mit anderen (Protein)-Bestandteilen auftreten. Fragmente als solche oder Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern als Bestandteile von Fusionsproteinen werden typischerweise durch die Methoden enzymatischer Spaltung, der Protein-Synthese oder die dem Fachmann geläufigen Rekombinationsmethoden hergestellt.

Bei den polyklonalen Antikörpern handelt es sich um heterogene Mischungen von Antikörpermolekülen, die aus Seren von Tieren hergestellt werden, die mit einem Antigen immunisiert worden sind. Ein monoklonaler Antikörper enthält eine im wesentlichen homogene Population von Antikörpern, die spezifisch gegen Antigene gerichtet sind, wobei die Antikörper im wesentlichen gleiche Epitop-Bindungsstellen aufweisen. Monoklonale Antikörper können durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren erhalten werden (z. B. Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US-Patent 4,376,110; Ausübel et al., Harlow und Lane "Antikörper": Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory (1988)). Die in den vorgenannten Literaturstellen enthaltene Beschreibung wird als Bestandteil der vorliegenden Erfindung in die Offenbarung der vorliegenden Erfindung einbezogen. Erfindungsgemäße Antikörper können einer der folgenden Immunglobulinklassen angehören: IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und ggf. einer Unterklasse der vorgenannten Klassen. Ein Hybridom-Zellklon, der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper produziert, kann in vitro, in situ oder in vivo kultiviert werden. Die Herstellung von großen Titern an monoklonalen Antikörpern erfolgt vorzugsweise in vivo oder in situ.

Bei den erfindungsgemäßen chimärische Antikörpern handelt es sich um Moleküle, die verschiedene Bestandteile enthalten, wobei diese sich aus verschiedenen Tierarten ableiten (z. B. Antikörper, die eine variable Region, die aus einem Mäuse-monoklonalen Antikörper abgeleitet ist, und eine konstante Region eines humanen Immunglobulin aufweisen). Chimärische Antikörper werden vorzugsweise eingesetzt, um einerseits die Immunogenizität bei der Anwendung zu reduzieren und andererseits die Ausbeuten bei der Produktion zu erhöhen, z.B. ergeben murine monoklonale Antikörper höhere Ausbeuten aus Hybridom-Zelllinien, führen aber auch zu einer höheren Immunogenizität beim Menschen, so daß human/murine chimärische Antikörper vorzugsweise eingesetzt werden.

Chimärische Antikörper und Verfahren zu ihrer Herstellung sind aus dem Stand der Technik bekannt (Cabilly et al., Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly et al., EP-A-125023; Neuberger et al., Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., EP-A-171496; Morrison et al., EP-A-173494; Neuberger et al., WO 86/01533; Kudo et al., EP-A-184187; Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., WO 87/02671; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, Antikörper: A Laboratory Manual, wie oben zitiert. Diese Zitatstellen werden als zur Offenbarung gehörig in die vorliegende Erfindung einbezogen.

Ganz besonders bevorzugt wird ein solcher erfindungsgemäßer Antikörper gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet sein (Anspruch 14).

Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper ist ein Antikörper, der eine Determinante, die im allgemeinen

mit der Antigenbindungsstelle eines erfindungsgemäßen Antikörpers assoziiert ist, erkennt. Ein anti-idiotypischer Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tieres der gleichen Art und des gleichen genetischen Typs (z.B. eines Mäusestamms) als Ausgangspunkt für einen monoklonalen Antikörper, gegen welchen ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper gerichtet ist, hergestellt werden. Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des immunisierenden Antikörpers durch die Produktion eines Antikörpers, der gegen die idiotypischen Determinanten gerichtet ist (nämlich ein erfindungsgemäßer anti-idiotischer Antikörper), erkennen (U.S. 4,699,880). Ein erfindungsgemäßer anti-idiotypischer Antikörper kann auch als Immunogen eingesetzt werden, um eine Immunantwort in einem weiteren Tier hervorzurufen und um dort zur Produktion eines sog. anti-anti-idiotypischen Antikörpers zu führen. Der anti-anti-idiotypische Antikörper kann, muß aber nicht, bezüglich seiner Epitop-Konstruktion identisch mit dem originären monoklonalen Antikörper sein, der die anti-idiotypische Reaktion hervorgerufen hat. Auf diese Weise können durch die Verwendung von gegen idiotypische Determinanten eines monoklonalen Antikörpers gerichtete Antikörper andere Klone, die Antikörper von identischer Spezifität exprimieren, identifiziert werden.

Monoklonale Antikörper, die gegen erfindungsgemäße Proteine, Analoge, Fragmente oder Derivate dieser erfindungsgemäßen Proteine gerichtet sind, können eingesetzt werden, um die Bindung von anti-idiotypischen Antikörpern in entsprechenden Tieren, wie z. B. der BALB/c Maus, zu induzieren. Zellen aus der Milz einer solchen immunisierten Maus können verwendet werden, um anti-idiotypische Hybridom-Zelllinien, die anti-idiotypische monoklonale Antikörper sekretieren, zu produzieren. Weiterhin können anti-idiotypische monoklonale Antikörper auch an einen Träger gekoppelt

werden (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") und dann verwendet werden, um weitere BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Die Sera dieser Mäuse enthalten dann anti-anti-idiotypische Antikörper, die die Bindungseigenschaften der originären monoklonalen Antikörper haben und spezifisch für ein Epitop des erfindungsgemäßen Proteins oder eines Fragments oder Derivats von demselben sind. Die anti-idiotypischen monoklonalen Antikörper haben auf diese Weise ihre eigenen idiotypischen Epitope oder "Idiotope", die strukturell mit dem zu untersuchenden Epitop ähnlich sind.

Die Bezeichnung "Antikörper" soll sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente derselben einschließen, z.B. Fab und $F(ab')_2$. Fab und $F(ab')_2$ -Fragmente entbehren eines Fc-Fragments, wie etwa in einem intakten Antikörper vorhanden, so daß sie im Blutkreislauf schneller transportiert werden können und vergleichsweise weniger nicht-spezifische Gewebsbindung als intakte Antikörper aufweisen. Hierbei wird hervorgehoben, daß Fab und $F(ab')_2$ Fragmente von erfindungsgemäßen Antikörpern bei der Detektion und Quantifizierung von erfindungsgemäßen Proteinen eingesetzt werden können. Solche Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung hergestellt, indem Enzyme, wie z. B. Papain (zur Herstellung von Fab-Fragmenten) oder Pepsin (zur Herstellung von $F(ab')_2$ Fragmenten) verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antikörper, einschließlich der Fragmente von diesen Antikörpern, können zur quantitativen oder qualitativen Detektion von erfindungsgemäßen Protein in einer Probe eingesetzt werden oder auch zur Detektion von Zellen, die erfindungsgemäße Proteine exprimieren und ggf. sekretieren. Die Detektion kann mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Verfahren erreicht werden, die Fluoreszenz-markierte Antikörper in Kombination mit

Lichtmikroskopie, Flußzytometrie oder fluorometrischer Detektion durchgeführt werden.

Erfindungsgemäße Antikörper (oder Fragmente dieser Antikörper) eignen sich für histologische Untersuchungen, wie z.B. im Rahmen der Immunofluoreszenz oder Immunoelktromikroskopie, für die in situ Detektion eines erfindungsgemäßen Proteins. Die in situ Detektion kann dadurch erfolgen, daß eine histologische Probe von einem Patienten genommen wird und markierte erfindungsgemäße Antikörper zu einer solchen Probe hinzugegeben werden. Der Antikörper (oder ein Fragment dieses Antikörpers) wird in markierter Form auf die biologische Probe aufgetragen. Auf diese Weise ist es nicht nur möglich, die Anwesenheit von erfindungsgemäßigem Protein in der Probe zu bestimmen, sondern auch die Verteilung des erfindungsgemäßen Proteins in dem untersuchten Gewebe. Bei der biologischen Probe kann es sich um eine biologische Flüssigkeit, ein Gewebeextrakt, geerntete Zellen, wie z. B. Immunzellen oder Herzmuskel- oder Leberzellen, oder allgemein um Zellen, die in einer Gewebekultur inkubiert worden sind, handeln. Die Detektion des markierten Antikörpers kann je nach Art der Markierung durch im Stand der Technik bekannte Verfahren (z. B. durch Fluoreszenzverfahren) erfolgen. Die biologische Probe kann aber auch auf einem Festphasenträger, wie z. B. Nitrocellulose oder ein anderes Trägermaterial, aufgetragen werden, so daß die Zellen, Zellteile oder löslichen Proteine immobilisiert werden. Der Träger kann dann mit einem geeigneten Puffer ein- oder mehrfach gewaschen werden, wobei nachfolgend mit einem detektierbar markierten Antikörper nach der vorliegenden Erfindung behandelt wird. Der Festphasenträger kann dann mit dem Puffer ein zweites Mal gewaschen werden, um nicht-gebundenen Antikörper zu beseitigen. Die Menge an gebundener Markierung auf dem Festphasenträger kann dann mit einem herkömmlichen Verfahren bestimmt werden.

Als Träger eignen sich insbesondere Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon-Amylasen, natürliche oder modifizierte Zellulosen, Polyacrylamide und Magnetit. Der Träger kann entweder bedingt löslichen oder unlöslichen Charakters sein, um die Bedingungen nach Maßgabe der vorliegenden Erfindung zu erfüllen. Das Trägermaterial kann beliebige Formen einnehmen, z. B. in Form von Kügelchen ("beads"), oder zylindrisch oder sphärisch sein, wobei Polystyrol-Kügelchen als Träger bevorzugt sind.

Eine detektierbare Antikörpermarkierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Beispielsweise kann der Antikörper an ein Enzym gebunden werden, wobei das Enzym schließlich in einem Immunoassay (EIA) eingesetzt werden kann. Das Enzym kann dann später mit einem entsprechenden Substrat reagieren, so daß eine chemische Verbindung entsteht, die auf eine dem Fachmann geläufige Art und Weise detektiert und ggf. quantifiziert werden kann, z. B. durch Spektrophotometrie, Fluorometrie oder andere optische Verfahren. Bei dem Enzym kann es sich um Malat-Dehydrogenase, Staphylokokken-Nuklease, delta-5-Steroid Isomerase, Hefe-alkohol-Dehydrogenase, alpha-Glycerophosphat-dehydrogenase, Triosephosphatisomerase, Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase, Aspariginase, Glucoseoxidase, beta-Galactosidase, Ribonuklease, Urease, Katalase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glucoamylase oder Acetylcholinesterase handeln. Die Detektion wird dann über ein chromogenes Substrat, das spezifisch für das für die Markierung eingesetzte Enzym ist, ermöglicht und kann schließlich z.B. über Sichtvergleich des durch die Enzymreaktion umgesetzten Substrats im Vergleich zu Kontrollstandards erfolgen.

Weiterhin kann die Detektion durch andere Immunoassays sichergestellt werden, z.B. durch radioaktive Markierung der Antikörper oder Antikörperfragmente (also durch einen

Radioimmunoassay (RIA; Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T. et al. North Holland Publishing Company, New York (1978). Das radioaktive Isotop kann dabei durch die Verwendung von
5 Szintillationszählern oder durch Autoradiographie detektiert und quantifiziert werden.

Fluoreszierende Verbindungen können gleichfalls zur Markierung eingesetzt werden, beispielsweise Verbindungen wie Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin,
10 Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin. Auch fluoreszenzemittierende Metalle, wie z. B. ^{152}E oder andere Metalle aus der Lanthanid-Gruppe, können eingesetzt werden. Diese Metalle werden an den Antikörper über Chelatgruppen, wie z. B.
15 Diethylentriaminpentaessigsäure (ETPA) oder EDTA angekoppelt. Weiterhin kann der erfindungsgemäße Antikörper über eine mit Hilfe von Chemilumineszenz wirkende Verbindung angekoppelt werden. Die Gegenwart des Chemilumineszenz-markierten Antikörpers wird dann über
20 die Lumineszenz, die im Verlauf einer chemischen Reaktion entsteht, detektiert. Beispiele für derartige Verbindungen sind Luminol, Isoluminol, Acridiniumester, Imidazol, Acridiniumsalz oder Oxalatester. Gleichermaßen können auch biolumineszente Verbindungen zum Einsatz
25 kommen. Biolumineszenz ist eine Unterart der Chemilumineszenz, die bei biologischen Systemen vorgefunden wird, wobei ein katalytisches Protein die Effizienz der chemilumineszenten Reaktion verstärkt. Die Detektion des biolumineszenten Proteins erfolgt wiederum
30 über die Lumineszenz, wobei als biolumineszente Verbindung beispielsweise Luciferin, Luciferase oder Aequorin in Betracht kommen.

Ein erfindungsgemäßer Antikörper kann für die Verwendung in einem immunometrischen Assay, auch bekannt als "two-
35 site" oder "sandwich" Assay, zur Anwendung gelangen. Typische immunometrische Assay-Systeme schließen sog.

"Vorwärts"-Assays ein, die sich dadurch auszeichnen, daß erfindungsgemäße Antikörper an ein Festphasensystem gebunden sind und daß der Antikörper mit der Probe, die untersucht wird, auf diese Weise in Kontakt gebracht wird. Derart wird das Antigen aus der Probe durch die Bildung eines binären Festphasen-Antikörper-Antigen-Komplexes aus der Probe isoliert. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird der feste Träger gewaschen, um den verbleibenden Rest der flüssigen Probe zu beseitigen, einschließlich des ggf. nicht gebundenen Antigens, und daraufhin mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die eine unbekannte Menge an markiertem Detektionsantikörper enthält. Der markierte Antikörper dient hierbei als sog. Reporter-Molekül. Nach einer zweiten Inkubationszeit, die es den markierten Antikörper erlaubt, mit dem an die Festphase gebundenen Antigen zu assoziieren, wird der Festphasenträger erneut gewaschen, um markierte Antikörper, die nicht reagiert haben, zu beseitigen.

In einer alternativen Assay-Form kann auch ein sog. "sandwich"-Assay zum Einsatz kommen. Hierbei kann ein einziger Inkubationsschritt ausreichen, wenn der an die Festphase gebundene Antikörper und der markierte Antikörper beide gleichzeitig auf die zu testende Probe aufgebracht werden. Nach Abschluß der Inkubation wird der Festphasenträger gewaschen, um Rückstände der flüssigen Probe und der nicht-assoziierten markierten Antikörper zu beseitigen. Die Anwesenheit von markiertem Antikörper auf dem Festphasenträger wird genau so bestimmt, wie bei den konventionellen "Vorwärts"-Sandwich-Assay. Bei dem sog. reversen Assay wird schrittweise zunächst eine Lösung des markierten Antikörpers zur Flüssigprobe hinzugefügt, gefolgt von der Beimischung von nicht-markiertem Antikörper, gebunden an einen Festphasenträger, nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit. Nach einem zweiten Inkubationsschritt wird der Festphasenträger in herkömmlicher Weise gewaschen, um ihn von Probenüberresten und von markiertem Antikörper, der nicht

reagiert hat, zu befreien. Die Bestimmung des markierten Antikörpers, der mit dem Festphasenträger reagiert hat, wird dann, so wie oben beschrieben, durchgeführt.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei die Wirtszellen mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert und dann unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen
10 kultiviert werden, so daß das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt werden kann (Anspruch 15). Das Protein der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz kann dabei, abhängig von dem Expressionssystem, aus einem Kulturmedium oder aus Zellextrakten isoliert werden. Der Fachmann kann
15 ohne weiteres erkennen, daß die jeweiligen Isolierungsmethoden und das Verfahren bei der Aufreinigung des von einer erfindungsgemäßen DNA codierten, rekombinanten Proteins stark vom Typ der Wirtszelle oder auch von dem Umstand, ob das Protein in das Medium
20 sekretiert wird, abhängt. Zum Beispiel können Expressionssysteme eingesetzt werden, die zur Sekretion des rekombinanten Proteins führen. Das Kulturmedium muß in diesem Fall durch kommerziell erhältliche Proteinkonzentrationsfilter, z.B. Amicon oder Millipore Pelicon, aufkonzentriert werden. Nach dem
25 Konzentrationsschritt kann ein Reinigungsschritt erfolgen, z.B. ein Gelfiltrationsschritt. Alternativ kann aber auch ein Anionenaustauscher eingesetzt werden, der eine Matrix mit DEAE aufweist.

30 Als Matrix dienen dabei alle aus der Proteinreinigung bekannten Materialien, z.B. Acrylamid oder Agarose oder Dextran oder ähnliches. Es kann aber auch ein Kationenaustauscher eingesetzt werden, der dann typischerweise
35 Carboxymethyl-Gruppen enthält. Zur weiteren Reinigung eines durch eine erfindungsgemäße DNA codierten Proteins

können dann HPLC-Schritte dienen. Es kann sich um einen oder mehrere Schritte handeln. Insbesondere wird die "Reversed- Phase"-Methode eingesetzt. Diese Schritte dienen zum Erhalt eines im wesentlichen homogenen rekombinanten Proteins einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.

Neben bakteriellen Zellkulturen zur Isolierung des Genprodukts können auch transformierte Hefezellen eingesetzt werden. In diesem Fall kann das translatierte Protein sekretiert werden, so daß die Proteinreinigung vereinfacht wird. Sekretiertes rekombinantes Protein aus einer Hefewirtszelle kann durch Methoden erhalten werden, wie sie bei Urdal et al. (J. Chromato. 296:171 (1994)) offenbart sind.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, wobei Wirtszellen mit einem Expressionsvektor, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält, transformiert werden (Anspruch 17). Dieses Verfahren zur Expression von Genprodukten, die auf einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz beruhen, dient nicht dazu, das entsprechende Genprodukt zu konzentrieren und aufzureinigen, sondern vielmehr dazu, den Zellstoffwechsel durch das Einführen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen über die Expression des dazugehörigen Genprodukts zu beeinflussen. Hier ist insbesondere an die Verwendung der mit Hilfe von Expressionsvektoren transformierten Wirtszellen zum Zwecke der Ausschaltung der inflammatorischen Reaktion zu denken. Durch die Verwendung eines sogenannten konstitutiven Promotors können in diesen Zellen gleichbleibende Konzentrationen von auf erfindungsgemäßen Sequenzen beruhenden Proteinen exprimiert werden. Auf diese Weise wird dauerhaft die Auslösung der Inflammation unterbunden.

Die entsprechenden Zelllinien werden dadurch gegenüber einer Vielzahl von inflammatorischen Stimulanzen resistent. Diese modifizierten Zellen können auch
5 gegebenenfalls wieder in den Säuger- oder humanen Organismus rücküberführt werden. Auf diese Weise wird durch in vitro mit den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren manipulierter Zellen und die anschließende Übertragung (Transplantation) in den
10 Organismus ein gentherapeutischer Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen möglich. Dabei werden Expressionsvektoren mit den erfindungsgemäßen Sequenzen vorzugsweise in solche Zellen transfiziert, die im Organismus einer Fehlsteuerung der Inflammation
15 anheimfallen (bspw. Hepatocyten bei chronischer Leberentzündung). Insbesondere werden in einem solchen gentherapeutischen Ansatz erfindungsgemäße Sequenzen eingesetzt, die das inflammatorische Signal blockieren, bspw. Fragmente, die das inflammatorische Signal nicht
20 weitertragen und damit die Signaltransduktion unterbrechen.

Mit dem vorliegenden Erfindungsgedanken geht aber auch ein gentherapeutisches Verfahren, das in vivo durchgeführt
25 werden kann, einher. Zu diesem Zwecke werden Vektoren eingesetzt (z.B. Liposomen, Adenoviren, Retroviren oder ähnliche oder auch nackte DNA), die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen gezielt in die gewünschten Zielzellen des Organismus insertieren. Bei den Zielzellen handelt es sich
30 typischerweise um Zellen, deren Inflamationsregulation gestört ist, insbesondere um Zellen, die pathologisch eine verstärkte Disposition zur Entzündungsreaktion zeigen (bspw. bei chronischer Leberentzündung). In diesem Zusammenhang können Fragmente einer erfindungsgemäßen DNA-
35 Sequenz zum Einsatz kommen, die inhibitorische Wirkung entfalten, bspw. DNA-Sequenzen, die im wesentlichen nur

die PYD-Domäne enthalten und damit nur noch eine Assziierungsfunktion wahrnehmen können, nicht aber weitergehend biologische Signale (zur Inflammation) weitergeben können - also keine weitere biologische Funktionalität aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz (Allele, Derivate, Fragmente) oder eines erfindungsgemäßen Genprodukts zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen (Anspruch 17). Die vorgenannte erfindungsgemäße Verwendung von DNA-Sequenzen schließt auch die Verwendung von oben beschriebenen erfindungsgemäßen Expressionsvektoren ein, die eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz, bspw. eine in Fig. 1 offenbarte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Derivat oder Allel einer solchen Sequenz (oder auch ein infunktionelles Derivat einer solchen Sequenz) aufweisen, mit dem Ziel, die fehlgeleitete intrazelluläre Signaltransduktion zu korrigieren. Die Verwendung kann nach gentherapeutischen Verfahren über Injektion von nackter erfindungsgemäßer DNA oder dem Protein oder über Genfähren, insbesondere virale oder liposomale Vektoren, erfolgen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher sowohl die Verwendung derartiger erfindungsgemäßer Expressionsvektoren sowie die erfindungsgemäße Verwendung von Zellen (d.h. die Verwendung zur Auslösung (oder zur Blockade) des Inflammationsgeschehens), die mit erfindungsgemäßen Expressionsvektoren transfiziert sind.

Im einzelnen läßt sich feststellen, daß derartige Gentherapieansätze sich bereits als wirksam bei der Therapie von genetisch bedingten Erkrankung, beispielsweise bei der Bluterkrankheit, und auch bei der Behandlung anderer genetischer Erkrankung, wie

beispielsweise cystischer Fibrose, sich als wirksam erwiesen haben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Nukleotidsequenz erfindungsgemäßer Art, beispielsweise eine Nukleotidsequenz gemäß den in Figur 1

5 enthaltenen Nukleotidsequenzen oder eine Variante (Derivat, Fragment (vor allem mindestens 100 Basen umfassen, oder Allel) dieser Sequenz in einen geeigneten Vektor überführt, der die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in die Säugetierzellen, vorzugsweise

10 Humanzellen, einschleust. Besonders geeignete Transfektionsvektoren für diese Anwendung sind Retroviren und Adenoviren. Alternativ können auch erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen in einem molekularen Konjugat mit einem Virus (beispielsweise einem Adenovirus) oder mit

15 viralen Komponenten (beispielsweise Capsidproteinen) komplexiert sein. Geeignete Methoden für die Bildung derartiger Vektoren sind im Stand der Technik wohl bekannt, wobei beispielsweise auf die Offenbarung in "Working toward Human Genetherapy", Kapitel 28 (in

20 Recombinant DNA, Second Edition, Watson GD et al, New York: Scientific American Books, S. 567 - 581, 1992) verwiesen wird. Bei einem derartigen gentherapeutischen Verfahren werden mit erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen transfizierte Vektoren in Zellen oder Geweben

25 vorzugsweise durch Injektion, Inhalation, orale Einnahme oder Aufnahme durch Schleimhäute dem betroffenen Patienten verabreicht. Ein derartiger Versuchsansatz wird im allgemeinen als in-vitro-Gentherapie bezeichnet. Alternativ können Zellen oder Gewebe, beispielsweise

30 hämatopoietische (Stamm)zellen aus dem Knochenmark oder andere adulte Stammzellen (vor allem Gewebespezifische Stammzellen), dem betroffenen Patienten entnommen werden und nach Maßgabe der im Stand der Technik bekannten Verfahren in-vitro kultiviert werden. Die entsprechend

35 ausgestalteten Vektoren mit den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen werden dann in-vitro den Zellen oder

Gewebe zugegeben, wobei vorzugsweise die Inkorporation derartiger Vektoren in die Zellen durch Elektroporation erfolgt. Die derart modifizierten Zellen oder Gewebe werden schließlich dem betroffenen Patienten
5 reimplantiert. Derartige gentherapeutische Verfahren werden als ex-vivo-Gentherapie bezeichnet. Für beide gentherapeutische Ansätze, also in-vivo- oder ex-vivo-Verfahren, können erfindungsgemäße Nukleotidsequenzen operativ mit einer regulatorischen DNA-Sequenz verbunden
10 werden, wobei es sich auch um eine heterologe regulatorische DNA-Sequenz handeln kann, so daß ein rekombinantes Konstrukt in der transfizierten Zelle vorliegt. Dieses Konstrukt kann dann in den Vektor insertiert werden und schließlich direkt dem betroffenen
15 Patienten in einem in-vivo-Gentherapieansatz bzw. den Zellen oder Geweben des betroffenen Patienten in einem ex-vivo-Gentherapieansatz zugeführt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das genetische Konstrukt in die Zellen oder die Gewebe des Tieres,
20 entweder in-vivo- oder ex-vivo in einem molekularen Konjugat mit einem Virus, (beispielsweise einem Adenovirus oder viralen Komponenten (beispielsweise viralen Capsid-Proteinen) zugeführt werden. Die oben beschriebenen gentherapeutischen Ansätze können entweder
25 (a) zu einer homologen Rekombination zwischen der Nukleotidsequenz und dem infunktionellen Gen in den Zellen des betroffenen Tieres oder (b) zu einer zufälligen Insertion des Gens an einer beliebigen Stelle im Wirtszellgenom oder (c) zur Inkorporation des Gens in
30 den Zellkern führen, wobei es dann als extrachromosomales genetisches Element vorliegen kann. Die Offenbarung derartiger Verfahren und Ansätze zur Gentherapie können dem US-Patent US 5,578,461, der WO 94/12650 und der WO 93/09222 entnommen werden, die
35 Bestandteil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung sind. Die transfizierten Wirtszellen, die homolog oder

heterolog sein können, können mit einer semipermeablen Schicht eingehüllt werden und derart in die betroffenen Patienten reimplantiert werden, wobei auf diese Weise ein Angriff des Immunsystems des Patienten auf die reimplantierten Zellen verhindert wird (siehe WO 93/09222).

Bevorzugt ist dabei die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder eines erfindungsgemäßen Genprodukts, wenn es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt (Anspruch 18). Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung einer solchen DNA-Sequenz oder eines solchen Genprodukts zur Behandlung (zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung) von Psoriasis, Arteriosklerose, bakteriellen oder viralen Infektionserkrankungen, insbesondere bakterieller oder viraler Meningitis oder bakterieller Pneumonie, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomerulärer Nephritis oder Osteoarthritis (Anspruch 19). Dies kann bspw. durch Fragmente erreicht werden, die die Signaltransduktion blockieren, bspw. um Sequenzen, die nur für die PYD-Domäne (oder Teile hiervon) codieren bzw. nur diese enthalten.

Gemäß einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung zur Verfügung gestellt, die dadurch gekennzeichnet, daß sie die Funktion der erfindungsgemäßen Genprodukte (Proteine) als intrazelluläres Signalmolekül einer inflammatorischen Signalkaskade zur Auslösung von Entzündungsreaktionen inhibiert. Insbesondere blockieren erfindungsgemäße Verbindungen die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung (Anspruch 20). Bevorzugt handelt es sich bei einer erfindungsgemäßen chemischen Verbindung, die die erfindungsgemäße PYD-Funktion (bspw. bei Inflammation oder Apoptose)

blockiert, um ein Oligopeptid, das chemisch modifiziert (bspw. zur erleichterten Passage durch die Zellmembran, insbesondere durch endständige (vor allem N-terminale) Sequenzbereiche) sein kann oder nicht-modifiziert sein
5 kann. Insbesondere kann es sich um einen an der PYD-Assoziierung beteiligten nativen Sequenzbereich eines erfindungsgemäßen Proteins handeln. Zu nennen wären bspw. sog. DN-Varianten (bspw. die AS 1 bis 94 von humanem Pycard oder entsprechende PYD-Domänen von NALP-Proteinen
10 (s. Figur 1)), die bspw. auch die nachfolgend beschriebenen gentherapeutischen Verfahren verabreicht werden können. Derartige DN-Varianten können auch ausschließlich die NAD-Domäne oder einen Teil derselben oder eine die LRR-Domäne oder einen Teil derselben oder
15 eine CARD-Domäne oder einen Teil derselben enthalten und auf diese Weise dominant negativ die Signalkaskade, insbesondere inflammatorische Signalkaskaden blockieren. Weiter unten sind die medizinischen Indikationen für Verwendung (Arzneimittelherstellung) derartiger DN-Varianten nativer
20 erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart. Erfindungsgemäß werden somit Sequenzen einzelner Domänen (LRR, PYD, CARD, NAD) erfindungsgemäßer Sequenzen offenbart.

Damit kann bspw. ein erfindungsgemäße inhibitorisches Molekül, vorzugsweise ein Tetra- bis Dodekamer, eine dem
25 nativen Substrat entsprechende Aminosäuresequenz enthalten oder aus einer nativen Substratsequenz bestehen, wobei das vorzugsweise Tetra- bis Dodekamer typischerweise auch einen Sequenzabschnitt aus einer PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins aufweist. Ggf.
30 kann ein derartiges Oligopeptid auch dadurch chemisch modifiziert sein, daß die amidartige Bindung zwischen den einzelnen Aminosäuren durch eine gegen proteolytischen Abbau resistente alternative chemische Gruppe (bspw. Schwefel- oder Phosphorbrücken) ersetzt wird.

35 Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung ist vorzugsweise eine organisch-chemische Verbindung mit

einem Molekulargewicht von <5000, insbesondere <3000, vor allem <1500 und ist typischerweise physiologisch gut verträglich (Anspruch 21). Ggf. wird sie Bestandteil einer Zusammensetzung mit mindestens einem weiteren
5 Wirkstoff sowie vorzugsweise Hilfs- und/oder Zusatzstoffen sein und als Arzneimittel eingesetzt werden können. Besonders bevorzugt wird das organische Molekül dann sein, wenn die Bindungskonstante für die Bindung an ein erfindungsgemäßes Protein, insbesondere an die
10 Domäne PYD eines erfindungsgemäßen Proteins, mindestens 10^7 mol^{-1} beträgt. Die erfindungsgemäße Verbindung wird vorzugsweise so beschaffen sein, daß sie die Zellmembran passieren kann, sei es durch Diffusion oder über (intra)membranöse Transportproteine (Anspruch 22).

15

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die erfindungsgemäße Verbindung ein Antikörper, vorzugsweise ein gegen die PYD-Domäne eines erfindungsgemäßen Proteins gerichteter
20 Antikörper, der ex vivo in retransplantierte Wirtszellen oder durch gentherapeutische in vivo Verfahren in Wirtszellen eingeschleust wird und dort als "intrabody" nicht sekretiert wird, sondern intrazellulär seine Wirkung entfalten kann. Durch derartige erfindungsgemäße
25 "Intrabodies" sind die Zellen vor einer inflammatorischen Reaktion geschützt. Eine derartige Vorgehensweise wird typischerweise für Zellen jener Gewebe in Betracht kommen, die beim Patienten eine pathophysiologisch übersteigertes inflammatorisches Verhalten zeigen, also
30 bspw. bei Hepatocyten (Leberentzündung), Keratinozyten, Bindegewebszellen, Immunzellen oder Muskelzellen. Entsprechend sind auch derartig mit erfindungsgemäßen "Intrabodies" gentherapeutisch modifizierte Zellen Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

35

Im einzelnen eignen sich erfindungsgemäße Antikörper gegen erfindungsgemäße Aminosäuresequenzen, insbesondere

erfindungsgemäße Antikörper, die gegen eine PYD-Domäne gerichtete sind, dann besonders, wenn sie beispielsweise als "single-chainFv" (scFv) oder Fab-Fragmente vorliegen und zur Erkennung der Zielstruktur (bspw. der PYD-Domäne) in verschiedene subzelluläre Kompartimente geleitet werden können, um dort die Aktivität des Zielmoleküls entweder direkt oder indirekt durch Interferenz mit den subzellulären Transportwegen zu blockieren. Beispielsweise kann für eine zielgerichtete subzelluläre Positionierung des Intrabodies ein ER-Retensionssignal (KDEL) an den C-Terminus des Antikörperfragments mit einer sogenannten "Leader-Sequenz" angehängt werden, was zu einer Retention im Lumen des endoplasmatischen Retikulums führt. Durch eine entsprechende mitochondriale Leadersequenz, beispielsweise der Cytochrom C-Oxidaseeinheit VIII, kann ein Transport in die Mitochondrien erreicht werden. Die cytoplasmatische Expression des Antikörpers wird dadurch sichergestellt, daß die Expression der Antikörperfragmente ohne irgendeine Signal- oder Leader-Sequenz erfolgt. Auch ein Transport in den Nukleus ist möglich, indem zum Beispiel vom großen SV 40 T-Antigen eine nukleäre Lokalisationssequenz gewählt wird (PKKKRKV), und zwar entweder am N- oder C-Terminus. Entsprechende technische Maßnahmen müssen eingesetzt werden, um die Expression im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas unter Ausbildung von Disulfid-Brücken sicherstellen zu können. Die nachfolgenden Veröffentlichungen aus dem Stand der Technik werden inhaltlich explizit in die vorliegende Offenbarung miteinbezogen (Marasco, 1997, Gene Therapy. 4, 11-15; Richardson, & Marasco, 1995, Trends Biotechnology 13, 306 - 310; Biocca und Cattaneo 1995, Trends Cell Biology 5, 248 - 252; Biocca et al, 1995, Bio/Techn. 13, 1110-1115, Biocca et al, 1990, EMBO Journal 9, 101 - 108; Piche et al, 1998, Cancer Research 58, 2134 - 2140; Rosso et al, 1996, Biochem. Biophys. Res. Communication 220, 255 bis 263).

Als weitere bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen (bspw. zur Inhibition von molekularen Mechanismen, die für überschießende Entzündungsereignisse ursächlich sind) kommen auch Sequenzen (DNA oder RNA) in Betracht, die im Zusammenhang mit anti-sense Technologien stehen. In diesem Fall werden antisense DNA oder RNA in Zellen eingeschleust (bspw. durch gentherapeutische Ansätze, bspw. Verwendung rekombinanter Viren, s.o.) und diese können auf diese Weise durch komplementäre Bindung transkribierter mRNA (für erfindungsgemäße PYD-Domänen enthaltende Proteine) die Translation der dazu gehörigen polymorphen genomischen Sequenz blockieren. Eine derartige Vorgehensweise ist insbesondere bei Patienten deren Expressionsniveaux von PYD-Domänen enthaltenden Proteinen pathologisch erhöht ist, relevant.

Weitere Verbindungen bzw. Therapieverfahren zur Behandlung der offenbarten medizinischen Indikationen (bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels) beruhen auf Ribozym-Methoden. Hierzu werden Ribozyme verwendet, die eine Ziel-mRNA schneiden können. Im vorliegenden Fall werden daher Ribozyme offenbart, die native mRNA von erfindungsgemäßen Proteinen (bspw. NALP1 oder anderen PYD-Domänen enthaltenden Proteinen) spalten können. Erfindungsgemäße Ribozyme müssen dabei mit der erfindungsgemäßen Ziel-mRNA interagieren können, bspw. über Basenpaarung, und anschließend die mRNA spalten, um die Translation von bspw. NALP1 oder Pycard zu blockieren. Die erfindungsgemäßen Ribozyme werden über geeignete Vektoren in die Zielzellen geschleust (insbesondere Plasmide, modifizierte Tierviren, insbesondere Retroviren), wobei die Vektoren neben ggf. anderen Sequenzen eine cDNA -Sequenz für ein erfindungsgemäßes Ribozym aufweist.

Eine erfindungsgemäße chemische Verbindung mit der Funktion der Blockade der bspw. inflammatorischen

Funktion von erfindungsgemäßen physiologischen Proteinen (s. Fig. 1) kann als Arzneimittel Verwendung finden. Insbesondere ist eine erfindungsgemäße chemische Verbindung (zur Herstellung eines Arzneimittels) zur
5 Behandlung von Erkrankungen, für die zumindest tw. eine pathologische hyperinflammatorische Reaktion kausal oder symptomatisch ist, geeignet. Damit kann ein erfindungsgemäßer Inhibitor der zellulären Funktion eines erfindungsgemäßen Proteins, also bspw. der
10 inflammatorischen Reaktion, insbesondere ein Inhibitor der Assoziierung von PYD-Domänen, zur Inflammationsinhibition ganz besonders bei der Behandlung der folgenden Erkrankungen bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der folgenden Erkrankungen
15 eingesetzt werden: Autoimmunerkrankungen, Psoriasis, Arteriosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose,
20 glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Anspruch 23).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren ("Screening-Methoden") zur Identifizierung von Verbindungen (organisch-chemischen Verbindungen,
25 Biomoleküle (bspw. Oligonukleotide, Antikörper oder Antikörperfragmente, Oligopeptide, Ribozyme, DN-Mutanten von erfindungsgemäßen Proteinen) mit inhibitorischen Eigenschaften in Hinblick auf die Auslösung oder Weiterleitung von Signalen, die mit inflammatorischen
30 Reaktionen in Zusammenhang stehen, insbesondere von Verbindungen die die Interaktion von Proteinen der inflammatorischen Signalkaskade, insbesondere von physiologisch miteinander reagierenden PYD-Domänen (gleicher oder verschiedener Proteine) blockieren (bspw.
35 die Assoziierung des Inflammosoms blockieren, indem bspw. die Assoziierung von NALP1 und Pycard inhibiert wird).

Andere erfindungsgemäße Angriffspunkte der Interaktion sind bspw. die Inhibition der Interaktion zwischen der CARD-Domäne von Caspase-1 und der CARD-Domäne von Pycard oder die Inhibition der Interaktion der CARD-Domäne von
5 Caspase-5 und NALP1. Schließlich kann es auch bevorzugt sein, dass erfindungsgemäße Verbindungen die Wechselwirkung der LRR-Domäne von Proteinen der NALP-Klasse, bspw. NALP1, mit weiter stromaufwärts liegenden Proteinen oder Stimuli, modulieren (blockieren oder
10 aktivieren). Ggf. können auch Verbindungen, die als Aktivatoren der vorgenannten Interaktionen wirken, bevorzugt sein.

Erfindungsgemäße Verfahren sehen vor, daß (a) Zellen, vor allem Hepatocyten, insbesondere T-Lymphocyten, so
15 modifiziert werden, daß sie eine inflammatorische Reaktion zeigen, (b) diese gemäß (a) modifizierten Zellen in einer Zellkultur bereitgestellt werden, (c) Testsubstanzen zur Zellkultur zugegeben werden, (d) die das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion der Zellen in
20 der Zellkultur bestimmt wird. Hierzu werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise mehrere parallele Versuche mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanz angesetzt, um im Falle einer die Inflammation inhibierenden Wirkung der Testsubstanz deren
25 ID₅₀-Wert bestimmen zu können.

Alternativ kann ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung der vorgenannten Verbindungen auch die folgenden Schritte umfassen: (a) ein in vitro Testsystem bereitgestellt wird, das mindestens eine erfindungsgemäße
30 DNA-Sequenz enthält, (b) in Form eines Hochdurchsatz-"Screenings" potentielle Wirkstoffsubstanzen dem gemäß (a) bereitgestellten in vitro Testsystem zugeführt werden, und (c) ein physikalisches, chemisches oder biologisches Signal in dem Testsystem zur Identifikation von
35 Wirkstoffsubstanzen detektiert wird. Chemische Bibliotheken können durchsucht werden, und zwar sowohl

nach aktivierenden oder inhibierenden Substanzen. In diesem Zusammenhang wird auf die Offenbarung des Lehrbuchs von Böhm, Klebe und Kubinyi (Wirkstoffdesign, 1996, Spektrum-Verlag, Heidelberg) verwiesen, auf das
5 diesbezüglich vollinhaltlich Bezug genommen wird. Insbesondere können Verbindungen, die einem der vorgenannten erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden, auch geeignet sein, das Expressionsniveau des nativer erfindungsgemäßer Sequenzen, bspw. von Pycard
10 oder NALP1, beeinflussen. Der Wirkungsmechanismus kann auf einer Beeinflussung bspw. der Aktivität des nativen Promotors beruhen, so dass die Transkriptionsaktivität moduliert wird.

Ein erfindungsgemäßes "Screening"-Verfahren kann auch mit
15 Hilfe von sogenannten "Proteomics"-Techniken durchgeführt werden. Hierzu werden zur Bestimmung eines Standards typische Unterschiede im Expressionsmuster von Zellen mit inflammatorischer Reaktion und Kontrollzellen experimentell erhoben. Methodisch wird für ein derartiges
20 Verfahren typischerweise die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Testsubstanzen, die das Expressionsmuster erfindungsgemäßer Substanzen verändern, können dann auf Grund der veränderten Expressionsmuster erkannt werden (s. auch die Offenbarung bei Rehm, H., Der
25 Experimentator, Spektrum-Verlag, 2000)

Über Strukturanalysen eines erfindungsgemäßen Proteins lassen sich gezielt außerdem erfindungsgemäße Verbindungen finden, die eine spezifische
30 Bindungsaffinität aufweisen (Rationales Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg)). Hier wird die Struktur oder eine Teilstruktur, Derivat, Allel, Isoform oder ein Teil einer solchen von einem der erfindungsgemäßen Proteine über
35 NMR- oder Röntgenkristallographie-Verfahren (nach entsprechender Kristallisierung, z.B. nach der Methode des „hängenden Tropfens“) ermittelt oder, sofern eine

solche hochaufgelöste Struktur nicht vorliegt, mit Hilfe von Strukturvorhersage-Algorithmen ein Strukturmodell eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. auch mit Hilfe von homologen bereits strukturell aufgeklärten Proteinen (z.B. von Rhodopsin), erstellt, und diese(s) benutzt, um mit Unterstützung von Molecular Modelling Programmen Verbindungen, die als Agonisten oder Antagonisten wirken können, zu identifizieren, für die sich eine hohe Affinität zum erfindungsgemäßen Protein vorhersagen läßt.

5 Ggf. lassen sich die oben bezeichneten Verfahren zur Strukturaufklärung auch miteinander kombinieren. Geeignete Kraftfelder werden zur Simulation der Affinität einer potentiell affinen Verbindung an eine interessante Substruktur eines erfindungsgemäßen Proteins, bspw. das aktive Zentrum, eine Bindungstasche oder eine „hinge“-Region, eingesetzt. Diese Substanzen werden dann synthetisiert und in geeigneten Testverfahren auf ihr Bindungsvermögen und ihre therapeutische Nutzbarkeit getestet. Derartige in silico Verfahren zur

10 Identifizierung potentieller Wirkstoffe, die ihre Wirkung durch Bindung an erfindungsgemäße PYD-Domänen-Proteine entfalten, sind gleichfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15

25 Ferner werden auch, insbesondere in-vitro Verfahren offenbart, die es erlauben, nativ auftretende Polymorphismen der erfindungsgemäßen Proteine zu identifizieren. Für derartige Verwendungszwecke eignen sich insbesondere PCR-Methoden, insbesondere auch RT-PCR-Verfahren, also die Diagnose auf der Basis von mRNA, die in vitro entsprechend in cDNA übersetzt wird und dann mit Hilfe von herkömmlichen PCR-Verfahren vervielfältigt wird. Auch entsprechende Array-Techniken, die erfindungsgemäße Oligonukleotide auf einem Chip

30 positionieren, erlauben die Diagnostik mit Hilfe von Hybridisierungsreaktionen. Hierbei wird die Patientenprobe gegen einen Array mit erfindungsgemäßen Oligonukleotiden, die die erfindungsgemäßen

35

Polymorphismen einschließen, getestet. Positive Signale auf dem Array bei Oligonukleotiden, die mit Entzündungserkrankungen gekoppelte Polymorphismen aufweisen, lassen eine entsprechende Diagnose zu.

- 5 Schließlich sind Oligopeptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die mindestens 20, stärker bevorzugt mindestens 30 und noch stärker bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren umfassende Teilabschnitte der gemäß Figur 1
- 10 offenbarten Proteinsequenzen, insbesondere Sequenzen mit den Nummern 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, ..., 1.20. Derartige Teilsequenzen können nach dem Fachmann geläufigen Verfahren bspw. chemisch synthetisiert werden und können vorzugsweise als Antigene für die Produktion von
- 15 Antikörpern eingesetzt werden. Vorzugsweise wird es sich bei diesen Teilabschnitten von erfindungsgemäßen Proteinen bzw. deren Derivaten, Allelen oder Fragmenten offenbarten Sequenzen handeln, die im räumlichen Modell der Proteine solche Regionen besetzen, die zumindest teilweise die Proteinoberfläche ausmachen. Bevorzugte
- 20 Teilsequenzen von mindestens 20 AS Länge werden zumindest tw. die PYD-Domäne (s. Figur 7) (oder im Falle der Proteine der Klasse der NALP-Proteine die NAD-Domäne) der erfindungsgemäßen Proteine umfassen, insbesondere bevorzugt wird ein erfindungsgemäßer Teilabschnitt
- 25 mindestens 20 AS lange Peptide einer der erfindungsgemäßen Sequenzen gemäß Figur 7 zwischen Position 1 und Position 30 (gemäß Figur 7) aufweisen, bspw. das Peptid LENLPAEELKKFKLLSVPL (Position 1 bis 21, 21 AS Länge von humanem Pycard) oder die
- 30 entsprechenden aus Figur 7 entnehmbaren Sequenzen der weiteren erfindungsgemäßen Sequenzen, insbesondere aus der Klasse der NALP-Proteine.

- 35 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 stellt DNA-Sequenzen (einschließlich der entsprechenden Aminosäuresequenzen) dar, die an der inflammatorischen Signalkaskade beteiligt sind.

5 Fig. 2 zeigt eine Zusammenfassung der vorgenannten Sequenzen in tabellarischer Form, geordnet nach den in Fig. 1 bereits verwendeten Bezeichnungen, wobei etwaige EST-Klone, die Herkunft der Sequenz, die Lokalisierung auf einem Chromosom sowie eine Zusammenfassung der in den
10 jeweiligen Sequenzen enthaltenen Domänen (z. B. die PYD-Domäne, SPRY-Domäne, CARD-Domäne, NACHT-Domäne, die LRR-Domäne) angegeben sind. Unter (A), (B) und (C) sind die Sequenzen humanen Ursprungs zusammengefaßt, (D) enthält dagegen murine Sequenzen.

15 Fig. 3 zeigt das generalisierte "PYD"-Suchprofil, das eingesetzt wurde, um weitere PYD-Proteine in bspw. EST-Datenbanken aufzufinden. Hierbei wird auf die Veröffentlichung von Bucher et al. (1996, Computer Chem.,
20 20, 3-24) und auf die entsprechenden Erläuterungen in der offengelegten deutschen Patentanmeldung DE 197 13 393.2-41 verwiesen, die beide insoweit Bestandteil der vorliegenden Anmeldung sind. Hierdurch wurden zwei weitere PYD-enhaltende Proteine identifiziert, nämlich
25 NALP1 und NALP2 (die Bezeichnung NALP setzt sich aus den einzelnen in beiden Proteinen auftretenden charakteristischen Domänen zusammen: Domäne NACHT, LRR und PYD). Beide Proteine spielen eine entscheidende Rolle als Signaltransduktionsproteine für inflammatorische
30 Signale. Des weiteren kommt auch deren Funktion und damit Verwendung im Zusammenhang mit der apoptotischen Signalproteintransduktion in Betracht.

Im Ergebnis zeigt Fig. 4, daß Pycard mit Hilfe seiner
35 PYD-Domäne homodimerisiert und mit der PYD-Domäne von NALP1 interagiert. In der mittleren Darstellung wurden Zellextrakte, lysiert 24 Stunden nach der Transfektion, herangezogen und die anti-Flag-Immunopräzipitate auf die

Anwesenheit von VSV-Pycard untersucht. In der unteren Darstellung wurden die verschiedenen Flag-markierten Konstrukte (nämlich Pycard-PYD (also PYD von Pycard)), RAIDD, Apaf1-CARD (CARD von Apaf1, NALP1-PYD (PYD von NALP1), NALP1-CARD (CARD von NALP1) und ein Scheinvektor, in Hinblick auf ihre jeweilige Anwesenheit im Immunopräzipitat durch anti-Flag-Antikörper untersucht.

Fig. 5 zeigt im Teil A eine Ausrichtung von PYD-Domänen aus verschiedenen Proteinen ("alignment" vom N-Terminus zum C-Terminus). Die jeweiligen Sequenzpositionen mit einer mindestens 50%igen Identität bzw. mit zumindest ähnlichen Aminosäuren sind schwarz bzw. mit grauem Hintergrund unterlegt. Die Abkürzungen stehen für HS: homo sapiens und DR: Danio rerio (Zebrafisch). Die jeweiligen Zugangsnummern bei der Datenbank "Gen Bank" (EMBL) sind die folgenden: AF310103 für humanes Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1, AF310106 für NALP2, AAF66964 für das Protein CASPY vom Zebrafisch, AAF66956 für das Protein Pycard vom Zebrafisch.

Fig. 5B stellt in schematischer Weise die Domän-Struktur von Proteinen mit einer PYD-Domäne (Pyrin-Domäne) dar. Die Namensgebung für die einzelnen Homologiedomänen ist zu entnehmen der Figurenlegende in Anlage A12 unter Fig. 5.

Fig. 5C stellt die Aminosäuresequenz von NALP1 dar. Die verschiedenen Schattierungen entsprechen den für Fig. 5B gewählten domänenspezifischen Schattierungen: dunkelgrauer Hintergrund: PYD-Domäne, eingerahmter heller Hintergrund NACHT-Domäne, hellgrauer Hintergrund: LRR-Domäne und dunkler Hintergrund: CARD-Domäne.

Fig. 6 stellt eine Ausrichtung ("alignment") von repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD-Domäne) Todeseffektordomäne (DED) und Caspase-Rekrutierungsdomän

(CARD) und Todesdomäne (DD) dar. Die Ähnlichkeit der verschiedenen Domänen wird durch korrespondierende Aminosäuren, die schattiert dargestellt sind, deutlich. Auch auf dem Niveau der Sekundärstruktur gibt es erhebliche Ähnlichkeiten, wie durch die Sekundärstruktur-Vorhersage (hier für jeweils 6 α -Helices) deutlich wird.

Fig. 7 stellt eine Ausrichtung (vom N- zum C-Terminus, "alignment") von Aminosäuresequenzen der PYD-Domänen der folgenden Proteine dar: Pyrin, vom Menschen (hs), von der Maus (mm) und rn, Pycard vom Menschen und von der Maus menschliches Pyc, menschliches NALP1, menschliches NALP2, menschliches NALP3, menschliches NALP4, menschliches NALP5, menschliches NALP6, menschliches NALP7, menschliches NALP8, menschliches NALP9, menschliches NALP10, menschliches NALP11, murines NALP12, menschliches NALP13, murines NALP14, menschliches NALP15, menschliches PY10, murines PY16, CASPY1 vom Zebrafisch, CASPY2 vom Zebrafisch, Pycard vom Zebrafisch. In der letzten Zeile ist eine Hervorhebung der in einer Consensus-Sequenz auftretenden Sequenzposition markiert.

Fig. 8 stellt einen Stammbaum der identifizierten PYD-Domänen enthaltenden Proteine dar, wobei die Nähe des Verwandtschaftsgrades in diesem Stammbaum berücksichtigt ist. Damit zeigt der Stammbaum die vermeintliche Divergenz von durch genomischen evolutionär bedingten Duplizierungen erhaltenen Stammbaums.

Figur 9 zeigt, daß Pycard und NALP1 assoziieren und proinflammatorische Caspasen aktivieren können. Figur 9a stellt hierbei in schematisierter Form die Domänenstruktur von Apaf-1, NOD1, erfindungsgemäßem NALP1 und erfindungsgemäßem Pycard (Asc) dar. Die beiden aus dem Stand der Technik bekannten Proteine Apaf-1 und NOD1 weisen eine strukturelle Verwandtschaft mit den erfindungsgemäßen Proteinen auf. Hierbei sind die einzelnen Domänen mit Ihren Kurzbezeichnungen in Figur 9a

eingezeichnet, nämlich die Domänen CARD, PYD (Pyrin-Domäne), LRR ("Leucin-Rich"-Repeats), NBS (Nukleotid-Bindungsdomäne), WD-Domänen und eine in allen erfindungsgemäßen Proteinen der NALP-Klasse auftretende und hochkonservierte Domäne NAD (NALP-assoziierte Domäne). Die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard weisen darüber hinaus jeweils die charakteristische PYD-Domäne auf, über die die beiden Proteine erfindungsgemäß interagieren können.

10

Figur 9b stellt dar, daß die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 und Pycard nicht an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt sind. Hierzu wurden 293T-Zellen mit Plasmidkonstrukten von NOD1, RIP2, NALP1, NALP1-Nter, NALP1-Cter und Pycard sowie mit einem "Mock"-Vektor und mit NF- κ B-Luziferase-Reporter-Plasmiden transfiziert und die relative NF- κ B-Transkriptionsaktivität 24 Stunden nach Transfektion ermittelt. Es ist ohne weiteres erkennbar, daß ausschließlich die beiden Proteine NOD1 und RIP2 an der Induktion der NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind, während die erfindungsgemäßen Proteine NALP1 (bzw. Fragmente von NALP1) und Pycard eine Transkriptions-Aktivität auf dem Niveau des Mock-Vektors aufweisen, also NF- κ B nicht aktivieren.

25

Figur 9c stellt in der linken Auftragung Blots von überexprimiertem NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, die die NAD und CARD-Domäne enthalten) dar, wodurch eine Caspase-5 Prozessierung induziert wird. Hierzu wurden 293T-Zellen mit 0,5 μ g eines Caspase-5-Plasmids und der indizierten Menge an NALP1-Cter-, Pycard- oder FADD-Expressionsplasmiden transfiziert. Im dargestellten Western-Blot wurde Caspase-5 mit anti-Caspase-5-Antikörper bzw. NALP1 mit anti-Flag-Antikörper detektiert. Bei einer Menge von 3 μ g NALP1-Cter-

35

Expressionsplasmid war ein Expressionssignal der Procaspase im Zellextrakt bei Verwendung von anti-Caspase-5-Antikörpern kaum noch erkennbar, d.h. Caspase-5 war weitestgehend prozessiert worden. In der mittleren
5 Auftragung von Figur 9c ist erkennbar, daß NALP1 mit Caspase-5 interagiert. Hierzu wurde Caspase-5 (2 µg) mit 2 µg der induzierten Flag-markierten Expressionskonstrukte koexprimiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die anti-Flag (M2)-Immunopräzipitate
10 (IP) im Hinblick auf die Anwesenheit von Caspase-5 analysiert, und die Zellextrakte (xt) wurden mit den angegebenen Antikörpern immunogeblottet. Während im Zellextrakt (unterer Abschnitt der mittleren Figur) bei Koexpression mit NALP1-Cter kein Caspase-5-Signal nach
15 Einsatz von anti-Caspase-5-Antikörpern erkennbar war, geben die übrigen Versuchsansätze Banden für Caspase-5. In allen Versuchsansätzen (bis auf den Mock-Vektor) sind die entsprechenden Flag-markierten Konstrukte durch anti-Flag-Antikörper nachweisbar. Im Immunipräzipitat ist
20 Caspase-5 bzw. p35 nachweisbar. p35 ist ein Caspase-5 Spaltprodukt, das die CARD-Domäne und die p20 Caspase-Untereinheit enthält. Das * in Figur 9c (mittlere Darstellung, oben) zeigt die Position der IgG schwere Kette an. In der rechten Auftragung von Figur 9c sind die
25 Interaktion der verschiedenen CARD-Caspasen mit NALP1-Cter und dem Protein Raidd dargestellt. Die beiden vorgenannten Proteine wurden Flag-markiert und mit polyklonalem anti-Flag-Antikörper immunipräzipitiert. Die Caspasen wurden durch ihre HA (Hämagglutinin)-Markierung
30 detektiert. Eine Bande war für Caspase-5 bei Zugabe von erfindungsgemäßem NALP1-Cter deutlich erkennbar, schwache Signale auch für Caspase-2 und Caspase-4, d.h. die C-terminale CARD-Domäne von NALP1 interagierte am stärksten mit Caspase-5. Mit Caspase-9 konnte keine Interaktion
35 beobachtet werden.

Figur 9d enthält in der linken Darstellung die Ergebnisse von Versuchen, die zeigen, daß die Überexpression von erfindungsgemäßen Pycard die Spaltung von Caspase-1 induziert. Hierzu wurde analog zu Figur 9c (dort für 5 erfindungsgemäßes 'NALP1-Cter) das Zellextrakt untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei erhöhten Pycard-Konzentrationen, wie im mittleren Abschnitt von Figur 9d (linke Auftragung) durch anti-Pycard-Antikörper gezeigt, eine deutliche Reduktion der Caspase-1-Konzentration im 10 Zellextrakt nachweisbar war, verglichen mit den übrigen Banden, beispielsweise bei NALP1-Cter Zugabe oder FADD Zugabe. In der rechten Darstellung von Figur 9d wird gezeigt, daß Pycard gemeinsam mit Caspase-1 koimmunopräzipitiert. Der verwendete Antikörper ist gegen 15 den N-terminalen Abschnitt (CARD) von Caspase-1 gerichtet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die CARD-Domäne von Pycard stark mit der Caspase-1 interagiert und deren Aktivierung anstößt. Erfindungsgemäßes Pycard verbindet also als Adapter NALP1 20 und Caspase-1.

Figur 10 gibt die Ergebnisse von Experimenten wieder, die zeigen, daß die kombinierte Expression von Caspase-1 und Caspase-5 eine optimale Spaltung von pro-IL1 β induziert. 25 Hierbei wurden, wie in Figur 10a dargestellt, 293T-Zellen mit gleichen Mengen von aktivierten Caspase-1 und Caspase-5 Expressionskonstrukten gemeinsam mit entweder leeren Vektoren oder Expressionskonstrukten von NALP1-Cter und Pycard kotransfiziert. Die Caspase-induzierte 30 Spaltung von pro-IL β nach Aspartat 116 wurde unter Einsatz von Antikörpern, die spezifisch das p17 Spaltprodukt (IL-1 β *) von pro-IL1 β binden können, detektiert. Die Zellextrakte wurden dann immunogeblottet, um die Expressionsniveaus der transfizierten Proteine 35 bestimmen zu können. Hierbei zeigt sich im „Western Blot“ von Figur 10a, daß bei einer Kombination von Pycard,

NALP1-Cter, Caspase-1 und Caspase-5 mit Hilfe von anti-IL1 β *-Antikörpern IL-1 β * detektiert werden kann (s. Figur 10a oben). Die beiden Bildausschnitte im unteren Teil von Figur 10a geben die Kontrollexperimente mit Anti-Flag bzw. Anti-Pycard-Antikörpern wieder. Diese Ergebnisse entsprechen der Verteilung der entsprechenden Zielproteine in den vier Versuchsansätzen. Das Caspase-5-Spaltprodukt p35 ist mit anti-Caspase-5-Antikörper deutlich sichtbar nur in der rechten Spur der Auftragung in Figur 10a nachweisbar.

Figur 10b entspricht Figur 10a abgesehen davon, daß gleiche Mengen der Aktivatoren NALP1-Cter und Pycard mit pro-IL1 β kotransfiziert wurden und daß die Caspasen jeweils eigenständig exprimiert oder coexprimiert (rechte Spur) wurden. Das Spaltprodukt IL1 β * ist nur im Western Blot in der rechten Spur, also nach Coexpression, mit den entsprechenden Antikörpern nachweisbar.

Figur 11 stellt die parallele Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-5 während der pro-IL1 β Prozessierung in THP.1 Zellen, also unter physiologischen Bedingungen, dar. Hierbei wurde zunächst gemäß Figur 11a die Expression von NALP1, Pycard und Caspase-1 in verschiedenen Zelllinien durch Western-Blot-Analyse untersucht (293T-Zellen, Jurkat-Zellen, EL4-Zellen, A20, Raji-, Ramos-, BJAB-, THP-1-, U937-, K562-, Raw-, HeLa-Zellen). Hierzu wurden die Zellektrakte (30 μ g) mit polyklonalen Antikörpern gegen NALP1 sowie Pycard und monoklonalen Antikörpern gegen Caspase-1 versetzt. Die vorgenannten Zelllinien sind alle humanen Ursprungs, abgesehen von den Lymphozyten-Zelllinien A20 und EL4, die von Mäusen stammen. Das * bezieht sich auf ein Protein, das mit dem anti-Pycard-Antikörper kreuzreagiert und das wahrscheinlich einer kürzeren, alternative Spleißversion

von Pycard entspricht. In der rechten Auftragung von Figur 11a wurde eine Spezifitätskontrolle der in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden 293T-Zellen mit NALP1 und Pycard oder einem Mock-
5 Expressionskonstrukt transfiziert, und die Zellysate wurden mit dem entsprechenden Antikörper versetzt. Insgesamt zeigte sich bei den in Figur 11a dargestellten Versuchen, daß THP-1-Zellen eine starke Expression sowohl von NALP1, von Pycard als auch von Caspase-1 besitzen.
10 Sie eignen sich daher besonders als Untersuchungsobjekt für die Interaktion von NALP1, Pycard und Caspase-1. Die Spezifität der Antikörper ist, wie aus der rechten Auftragung in Figur 11a hervorgeht, ausgezeichnet.

15 In Figur 11b wurde die Expression von IL1 β und Caspase-5 vor und nach Stimulierung mit LPS (1 μ g/ml, 1h, Bedingungen wie im folgenden für Figur 11c beschrieben, dargestellt). Nach Stimulierung mit LPS ist hierbei im Zellextrakt mit den entsprechenden Antikörpern sowohl
20 Caspase-5 als auch pro-IL1- β nachweisbar. THP1-Zellen exprimieren Caspase-5 jedoch auch ohne LPS-Aktivierung.

Figur 11c gibt die Ergebnisse von Versuchen wieder, die sich ergeben, wenn Zellysate von mit LPS prästimulierten
25 THP.1-Zellen bei 30°C für die in Figur 11c oben dargestellten Zeiträume inkubiert wurden. Caspase-1-Aktivierung ist nämlich spontan zu beobachten, wenn cytoplasmatische Zellextrakte auf 30°C erwärmt werden. Es wurde die Aktivierung von Caspase-1, Caspase-5, Caspase-9
30 und pro-IL1 β , gefolgt vom Western Blotting in Gegenwart oder Abwesenheit von Caspase-Inhibitoren zVADfmk (50 μ M), YVADfmk (5 μ M) und Proteasom-Inhibitor LLnL (50 μ M) zeitabhängig ermittelt. Cytochrom C (1 ng) wurde zur Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 hinzugegeben. Die
35 monoklonalen Antikörper, die eingesetzt wurden, um

Caspase-5 und Caspase-9 zu detektieren, erkennen jeweils die p20-Untereinheit. In den vier Bildabschnitten der Figur 11c sind die jeweiligen Banden, die durch Markierung mit anti-Caspase-1-Antikörper, anti-Caspase-5-Antikörper, anti-Caspase-9-Antikörper und anti-IL1 β -Antikörper erhalten werden, dargestellt. Hierbei ergab sich, dass Caspase-9 nur prozessiert wurde, wenn Cytochrom C dem Zellextrakt hinzugegeben wurde. Die Caspase-1 und Caspase-5 hingegen zeigen ähnliche Kinetiken, weswegen beide auf einem Caspase-9-unabhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Die Caspasen-1 und -5 werden jeweils zeitabhängig nach Aktivierung in ihre Spaltprodukte zerlegt (p20, p35, Nter). Gleichzeitig mit der Aktivierung der Caspasen-1 und -5 (Auftreten der Spaltprodukte) kann das p17-Fragment (aktives Spaltprodukt von proIL-1 β) detektiert werden. Bei Zugabe der beiden Caspase-1-Inhibitoren zVADfmk und YVADfmk wurde die proIL-1 β -Aktivierung blockiert.

Schließlich sind in Figur 11d die Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1 β -Aktivierung nach Stimulierung von THP1-Zellen durch LPS (10 μ g/ml) (anstelle der Erhöhung der Inkubationstemperatur, wie in Fig. 11c) wiedergegeben. Die THP1-Zellen wurden mit PMA vor der LPS-Zugabe prästimuliert. Die Aktivierung von pro-IL1 β , Caspase-1 und Caspase-5 wurde sowohl in den Zellextrakten (xt) als auch in den Überständen (SN) gemessen. Die oberen drei Bildausschnitte stellen dabei die Messung in den Überständen (SN) dar, die unteren vier Bildausschnitte Messungen der Anwesenheit in Zellextrakten. Die einzelnen Spuren entsprechen unterschiedlichen Stimulationszeiträumen (mit oder ohne Zugabe von Caspase-Inhibitor zVAD). Die jeweils zur Detektion eingesetzten Antikörper sind links von den Bildausschnitten

verzeichnet, die entsprechenden Bandenpositionen sind rechts durch entsprechende Pfeile namentlich indiziert. PARP (unterster Bildausschnitt) ist ein Spaltprodukt, das der Caspase-3-Aktivierung erkennen läßt. Die Spaltung von pro-IL1 β wurde durch einen Antikörper, der spezifisch die 5 gespaltene Form von pro-IL1 β , also IL1 β^* , erkennt, detektiert (anti-IL1 β^*). Während in den Zellextrakten keine aktiven Formen von Caspase-1 oder Caspase-5 auftreten, sind diese ebenso wie die aktive Form p17 10 (aktives Spaltprodukt von proIL-1 β) in den Überständen nachweisbar. D.h. aktive Formen von Caspase-1 und Caspase-5 werden aus den Zellen gemeinsam mit p17 in den Überstand sezerniert. Eine Spaltung (Aktivierung) von PARP als proapoptotisches Signal (unterster 15 Bildausschnitt) findet dagegen erwartungsgemäß nicht statt.

Um zu überprüfen, ob NALP1, Caspase-1, Caspase-5 und Pycard tatsächlich zur Aktivierung von proIL-1 β 20 zusammenwirken, wurden nicht-aktivierte Zellextrakte von THP1-Zellen mit Gelfiltrationsmethoden untersucht. Figur 12 stellt Ergebnisse dar, die zeigen, dass die Bildung eines Komplexes stattfindet, der NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 enthält, das sogenannte Inflammosom. 25 Hierbei beruhen die in Figur 12a dargestellten Ergebnisse auf folgenden Versuchsansätzen: THP1-Zellysate wurden für die Dauer von 60 min bei 30°C inkubiert; diese Bedingungen führten zu spontaner Aktivierung von pro-IL1 β (s. Figur 11b). Hierzu wurden Zellextrakte 30 größenfraktioniert auf Superdex S-200 Säulen. Das Elutionsmuster von NALP1, Pycard und Caspase-1 in den Zellextrakten vor und nach der Aktivierung, d.h. nicht stimuliert und stimuliert, ist dargestellt. Die weißen Pfeile geben die Elutionspositionen der Proteine, die zu 35 einem Komplex von höherem Molekulargewicht hin verschoben

sind an (Inflammosom-Fraktionen 19 und 20). In der Kopfzeile von Figur 12a ist der Standard wiedergegeben (in kDa), also die Positionierung entsprechend großer Proteine in den einzelnen Fraktionen. Die verschiedenen Bildausschnitte geben die Elutionsprofile für NALP1, Pycard, Caspase-1 und FADD (letzteres zu Vergleichszwecken) wieder. Figur 12a zeigt, dass NALP1 (mit einem theoretischen Molekulargewicht von 156kDa) bereits ohne Stimulierung als Multiproteinkomplex vorliegt (ca. 700 kDa). Nach Auslösung der Caspase-1-Aktivierung kann eine deutliche Verschiebung des NALP1-Komplexes zu einem höheren Molekulargewicht (ca. 700 kDa) beobachtet werden. Auch Pycard und Caspase-1, die im nicht-stimulierten Zustand erwartungsgemäß bei ca. 30 kDa bzw. 60 kDa eluieren, werden nach Stimulation zumindest tw. auch in der 700 kDa-Fraktion, enthaltend NALP1, beobachtet. NALP1, Pycard und die beiden Caspasen Caspase-1 und Caspase-5 bilden das Inflammosom.

Figur 12b zeigt, daß NALP1, Pycard, Caspase-1 und Caspase-5 einen Komplex bilden, und zwar zeitabhängig. Hierbei wurden Extrakte von THP1-Zellen für verschiedene Zeiträume, wie in der Kopfzeile von Figur 12b wiedergegeben, stimuliert, indem bei 30°C inkubiert wurde. Die Immunopräzipitation erfolgte durch anti-Pycard-Antikörper (linke Auftragung) oder anti-NALP1-Antikörper (rechte Auftragung). Es wurde dann mit Hilfe der in Figur 12b jeweils dargestellten Antikörper im Western Blot die Anwesenheit von Caspase-1, Caspase-5 bzw. NALP1 untersucht. Wiederum sind rechts von den dargestellten Bildausschnitten die Positionen der dort zu erwartenden Proteine oder Proteinfragmente dargestellt (s.o.). Im Ergebnis coimmunopräzipitiert Caspase-1 entweder mit Pycard oder mit NALP1 in THP1-Zellextrakten in aktivierungsabhängiger Weise. Im Unterschied zum Zellextrakt lag im Immunopräzipitat im wesentlichen die

prozessierte (aktivierte) Form von Caspase-1 vor. Die Caspase-1-Bindung ist transient, da 2h nach der Stimulierung deutlich weniger Caspase-1 im Inflammosom nachweisbar war. Neben Caspase-1 immunopräzipitieren
5 anti-Pycard-Antikörper auch die Caspase-5 und NALP1 abhängig von der Stimulation.

Figur 13 gibt Ergebnisse wieder, die zeigen, daß Pycard (und NALP1) für die Caspase-1- und Caspase-5-Aktivierung
10 in THP1-Zellen unerläßlich ist. Hierzu wurden gemäß Figur 13a THP1-Zellysate bei 30°C für verschiedene Zeiträume und in Anwesenheit oder Abwesenheit von gegen beispielsweise Pycard oder NALP1 gerichteten Antikörpern und weiteren Kontroll-Antikörpern (MLTparacaspase,
15 TRAMP/DR3, RIP2) stimuliert. Die Aktivierung von Caspase-1 wurde dann, wie in Figur 11b, beschrieben weiterverfolgt. In den beiden Bildabschnitten der Figur 13a ist oben ein Western Blot mit anti-Caspase-1-Antikörpern und unten ein Western Blot mit anti-Caspase-
20 5-Antikörpern zu sehen. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Zugabe von anti-Pycard-Antikörpern zu Zellextrakten die Caspase-1-Aktivierung sofort herunterreguliert, die anderen zur Kontrolle eingesetzten Antikörper hingegen keinen Effekt bewirken. Anti-Pycard- oder anti-NALP1-
25 Antikörper bewirkten eine Inhibierung der Caspase-5-Aktivierung.

Figur 13b gibt die Dosisabhängigkeit der durch anti-Pycard-Antikörper erzielten Inhibition der Caspase-5
30 Aktivierung wieder. Diese Antikörper in entsprechenden Konzentrationen führen dazu, daß das p20-Spaltprodukt von Caspase-5 nicht mehr im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektierbar ist. Der inhibitorische Effekt von anti-Pycard-Antikörpern war also dosisabhängig.

Die Ergebnisse in Figur 13c bestätigen, daß anti-Pycard-Antikörper nicht mit der Cytochrom c-vermittelten Caspase-9-Aktivierung interferiert (die experimentellen Bedingungen sind im Zusammenhang mit Figur 11 beschrieben). Das Caspase-9-Spaltprodukt p20 ist mit anti-Caspase-9-Antikörpern nämlich weiterhin detektierbar, es findet also keine Inhibition statt.

Figur 13d stellt die Ergebnisse von Versuchen dar, bei denen THP1-Zellextrakte mit Protein G-adsorbierten, gegen Pycard oder NALP1 oder als Kontrolle Ig gerichteten Antikörpern inkubiert wurden. Nach der Entfernung der entsprechenden Kügelchen wurde der Immunniederschlag von Pycard und NALP1 durch Western-Blot-Analyse untersucht. Die Caspase-1-Aktivierung wurde dann durch eine Temperaturerhöhung von 0° auf 30°C hervorgerufen. Hierbei wird Caspase-9 nur aktiviert (also p20 vorhanden), wenn Cytochrom C den Proben hinzugegeben wird. Wenn Pycard durch Zugabe von entsprechenden Antikörpern aus dem Zellextrakt durch Fällung vor der Stimulierung entfernt wird, wurde die Caspase-1-Aktivierung vollständig blockiert. Trotz unvollständiger Fällung von NALP1 mit Hilfe entsprechender Antikörper wurde dennoch eine signifikante Reduktion der Caspase-1-Aktivierung beobachtet.

Figur 14 gibt die Inhibierung der pro-IL1 β Prozessierung durch dominant negative Varianten von Pycard (DN) wieder. Gemäß Figur 14a wurden THP1-Zellen durch Verwendung eines retroviralen Vektors, der die Flag-markierte Pyrin-Domäne (Aminosäuren 1 bis 94, ohne CARD-Domäne) von Pycard und ein Resistenz-Gen gegen Puromycin kodiert, infiziert. Dieses Konstrukt ohne CARD-Domäne bindet an NALP1, aber nicht an Caspase-1, ist also eine erfindungsgemäße Verbindung zur Blockade der NALP1/Pycard-induzierten Caspase-1-Aktivierung. Nach Selektion mit Puromycin

wurden stabil transfizierte Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Expression von Flag-markierten Proteinen durch Western-Blot-Analyse untersucht (gemäß Figur 14a sind zwei verschiedene Populationen dargestellt). Gemäß Figur 14a erhaltene stabil transfizierte Zellen, die DN-Pycard exprimieren, wurden mit LPS (10 µg/ml) für die angegebenen Zeitabschnitte behandelt, und die Prozessierung von Caspase-1, Caspase-5 und pro-IL1β in den entsprechenden Zellüberständen (SN), wie in Figur 11d beschrieben, bestimmt. In den linken Spuren wurde DN-Pycard hinzugegeben, in den rechten Spuren ein Mock-Vektor als Kontrolle.

In dem oberen Bildausschnitt von Figur 14b ist deutlich erkennbar, daß prozessiertes IL1β* in den angegebenen Stimulationszeiträumen nur dann auftritt, wenn entsprechende Mock-Konstrukte eingesetzt wurden, dagegen konnten nur ganz schwache Signale bei Anwesenheit von DN-Pycard beobachtet werden. Auch im Hinblick auf Caspase-1 und Caspase-5 sind die prozessierten Formen im Falle einer Zugabe von DN-Pycard nur in geringen Mengen nachweisbar, es findet also keine Aktivierung (Sekretion) der Caspasen-1 und -5 statt. Dagegen hatte die expression von DN-Pycard keine Wirkung auf die LPS-induzierte NF-kB-Aktivierung oder die pro-IL1β-Synthese.

Die beigegefügt, Anlagenblätter A1 bis A9 ist Bestandteil der vorliegenden Offenbarung.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher charakterisiert:

Ausführungsbeispiele

1. Ausführungsbeispiel

Um zu überprüfen, ob die PYD-Domänen - wie auch die Domänen DD, DED, CARD - die Eigenschaft haben, nur mit Mitgliedern innerhalb der eigenen Familie von "6-Helix-Bündel-Proteinen" zu interagieren, wurden Expressionsvektoren für PYD-Proteine hergestellt und mit Coimmunopräzipitations-Experimenten ihre Eignung zur Interaktion mit anderen Proteinen überprüft. Hierzu wurden Pycard-Konstrukte durch PCR-Techniken aus den folgenden IMAGE-EST-Klonen amplifiziert: AA528254(965955) und AI148558(1714818). Pycard wurde mit den folgenden Primern amplifiziert: JT1509 5'-ATGGGGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde mit JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3' amplifiziert.

NALP1-Konstrukte wurden mit PCR-Methoden amplifiziert, indem die KIAA0926-EST-Klone aus dem Kazusa-DNA-Research Institut als "Template" verwendet wurden. NALP1-PYD wurde mit JT1497 5'-ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-GATCCAGGGCATTAGCAC-3' amplifiziert. NALP1-CARD wurde mit JT1500 5'-GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-GATGAGACTCTGGTGTGG-3' amplifiziert.

Die amplifizierten Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (von Invitrogen) ligiert und in der EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag, die die PCR-3 (von Invitrogen) abgeleiteten Vektoren enthalten, subkloniert, wie bei Thome et al. (1999, J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben. Die anderen eingesetzten Konstrukte wurden bereits vorher bei Thome et al. (1999 J. Biol. Chem., 274, 9962-8) beschrieben und sind in Hinblick auf die Darstellung der experimentellen Ausführung Bestandteil der vorliegenden Offenbarung. Die Veröffentlichung von Burns et al. (1998, J. Biol. Chem., 273, 12203-12209) beschreibt die Durchführung der Immunopräzipitation. Sie ist gleichfalls Bestandteil der vorliegenden Offenbarung und läßt sich zusammengefaßt so darstellen:

293T-Zellen, die in DMEM-Medium kultiviert wurden, das mit 10%igen fötalem Kälberserum Glutamin ergänzt wurde, wurden mit einer Dichte von $1-3 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm-
5 Platte angesetzt und mit 3µg des jeweiligen Konstrukts am nächsten Tag durch die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Die Zellen wurden gesammelt und in Lyse-Puffer 24 bis 26 Stunden nach der Transfektion lysiert (der Lysepuffer enthält 0,2% NP40,
10 150mM NaCl, 50mM EDTA, 30mM Tris, pH 7,4). Die Zell-Lysate wurden für mindestens drei Stunden auf Sepharose 6B (von Pharmacia) vor der Präzipitierung mit einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für 4 Stunden mit 3µl einer Flag-Agarose (von Kodak International
15 Biotechnology) von 3µl von Sepharose 6B Kügelchen vorgereinigt. Das Harz wurde sechsmal in Lysepuffer gewaschen und nach der letzten Wäsche wurde gebundenes Protein durch Kochen im Probenpuffer eluiert, separiert durch SDS-PAGE und auf Nitrocellulose transferiert (von
20 Hybond ECL, Pharmacia), um nachfolgend das Western-Blotting durchführen zu können. Die anti-VSV und anti-Flag-Antikörper stammen von Sigma. Ein HRP-konjugierter Antikörper wurde eingesetzt, der spezifisch die schweren Ketten von murinem IgG1 (von Southern Biotechnology
25 Associates) detektierte.

Wie in Fig. 4 als Ergebnis des vorliegenden Ausführungsbeispiels gezeigt, konnte eine spezifische Bindung von Pycard mit dem PYD-Domän von Pycard und NALP
30 dann detektiert werden, wenn eine Coexpression mit VSV-markiertem Pycard, Flag-markierten Konstrukten, die entweder die PYD-Domäne von Pycard oder die PYD-Domäne von NALP1 enthalten coexprimiert wurden. Dagegen wurden keine Interaktion der PYD-Domäne von Pycard mit anderen
35 PYD-Domänen oder mit Todesdomänen, CARD-Domänen oder Todeseffektordomänen (letzteres ist in Fig. 4 nicht dargestellt)

festgestellt. Daher interagiert eine PYD-Domäne spezifisch mit PYD-Domänen über eine Protein-Protein-Wechselwirkung. Im Ergebnis zeigt Fig. 4 also, daß Pycard mit Hilfe seiner PYD-Domäne homodimerisiert und mit der
5 PYD-Domäne von NALP1 interagiert.

2. Ausführungsbeispiel

10 NALP1 Cter (AS 1030 bis 1430, der NAD- und der CARD-Domäne entsprechend), wurde mit Hilfe von JT1658 (5'-aaactcctggacgtgagcaag-3') und JT1500 (5'-tcagctgagtggcaggag-3') amplifiziert und in dem Säugerexpressionsvektor pCR3 im entsprechenden Leseraster
15 mit der "tag"-Markierung subkloniert. In ähnlicher Weise wurde NALP1 Nter (AS 1 bis 665, entsprechend der Pysin- und der NBS-Domäne) mit Hilfe der Primer JT1497 (5'-atggctggcggagcctggggc-3') und JT1526 (5'-caggcctagtattccata-3') amplifiziert. Die
20 Expressionskonstrukte für Caspase-4, Caspase-1, und Caspase-9, Flag-markiertem RIP2, Apaf1, RAIDD, Bcl10, IL-1 β , wurden entsprechend der Beschreibung bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998) und Thome et al. (J. Biol. Chem. 274, 9962 bis 9968 (1999)) zur Verfügung gestellt.
25 Die Plasmide, die für Caspase-5 und NOD1 kodieren, stammen von Christoph Fröhlich bzw. Gabriel Nunez (Department of Pathology, Univ. of Michigan Med School, 1500 E. Medical Center, Ann Arbor, MI 48109, USA).
Transiente Transfektion von 293T-Zellen, die Zellyse, die
30 Immunopräzipitationsanalyse, das "Immunoblotting" und der NF- κ B-Assay wurden so durchgeführt wie bei Thome et al. (Current Biology 8, 885 (1998)) beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird und was in die Offenbarung referenziell eingeschlossen ist. Die
35 vorgenannten Verfahren wurden wie an vorzitiertem Stelle beschrieben, durchgeführt, abgesehen von der Verwendung

von Ig schwerkettenspezifischen Antikörpern (HRP-konjugierten Ziegen-anti-Maus IgG1 und Ziegen-anti-Kaninchen IgG als Sekundärreagenz im Rahmen des "Western-Blottings" (Southern Biotechnology, Birmingham, GB).

5

Polyklonale Antikörper wurden durch Injektion von MAP-Peptiden, die den Aminosäuren 2 bis 25 von NALP1, den Aminosäuren 2 bis 27 von Pycard entsprechen in Kaninchen (Eurogentec, Belgien) und nachfolgender Immunoreinigung auf den entsprechenden Peptiden hergestellt. Der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen die CARD-Domäne von Caspase-1, stammt von Junying Yuan (Boston, MA 02115, USA, Harvard Medical School, 240 Longwood Av.)

15

Die weiteren Antikörper wurden von den folgenden Herstellern erworben: Caspase-5 (MBL), Caspase-9, PARP, gespaltenes IL-1 β D116 (Cell Signaling), Anti-Flag-Antikörper (M2, Sigma), Anti-VSV-Antikörper (P5D4, Sigma), Caspase-3 (Transduction Laboratories).

20

Zur in-vitro Caspase-1/pro-IL1 β -Aktivierung wurden THP.1 Zellen in Suspension in entsprechenden Flaschen in RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum, 50 μ M β -Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin (jeweils 100 μ g/ml) bis zu einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml aufgezogen und für eine Stunde mit LPS (1 μ g/ml) prästimuliert. Zytosolische Extrakte wurden, wie bei Liu et al. (Cell 86, 147 - 157, 1996) beschrieben, hergestellt. Zusammenfassend läßt sich hierzu sagen, daß die Zellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen wurden, in 5 Volumina eisgekühltem hypotonischen Puffer W (20 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM Na EDTA, 1 mM Na EGTA, und 0,1 mM PMSF) unter Hinzufügung eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Roche, Basel, CH) aufquellen

35

konnten. Nach einer 15 min. Eiskühlung wurden die Zellen durch 15-malige Passage durch eine G22-Nadel aufgebrochen. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände filtriert (0,45µ) und für den in-vitro IL-1β Spaltungsassay verwendet.

Die Immunopräzipitation von endogenem Caspase-1/NALP1, Pycard-Interaktionskomplex wurde unter Zuhilfenahme von 5×10^8 THP.1 Zellen pro Zeitpunkt durchgeführt. Die in-vitro Inflammosom-Aktivierung wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Mit 3 µg des indizierten Antikörpers bei 4°C im Puffer W, mit 20 µl Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) für 4 Stunden, wurde immunopräzipitiert. Die Komplexe wurden durch Zentrifugation wiedergewonnen und 6mal mit dem Puffer W gewaschen. Um Pyrin und NALP1 immunologisch niederzuschlagen, wurden THP.1-Zelleextrakte mit auf Protein-G-Kügelchen adsorbierten Antikörpern für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Entfernung der Kügelchen wurde die Caspase-1-Aktivierung durch Temperaturerhöhung auf 30°C angestoßen.

Die aktivierten Proben (inkubiert bei 30°C) oder die nicht-aktivierten Proben (bei 4°C belassen, Kontrollproben) wurden auf Superdex-200 HR 10/30 Säulen geladen und die Proteine wurden im Puffer W bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, als 0,5 ml Fraktionen, eluiert. Das "Western-Blotting" wurde nach Chloroform:Methanol-Präzipitierung der Gesamtfraktion durchgeführt. Die Säule wurde mit den folgenden Proteinen als Standard kalibriert: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserum-Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa).

Um eine LPS-Aktivierung der Caspase-1/Pro-IL-1 β -Aktivierung zu erreichen, wurden THP.1-Zellen mit 0,5 μ M PMA (Calbiochem) für die Dauer von 3 Stunden differenziert. Die Zellen wurden gewaschen und auf 24
5 "Well"-Platten bei einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro "Well" ausplattiert und dort belassen, um über Nacht sich anheften zu können. Nach dem Waschen im Medium ohne FCS, wurden die Zellen mit LPS 10 μ g/ml (E.coli 055:B5, Sigma), wie in Fig. 11 gezeigt, behandelt oder nicht behandelt.
10 Die Zellüberstände und Zellsiederschläge wurden entnommen und durch "Western-Blotting" hinsichtlich verschiedener Caspasen und IL-1 β analysiert.

Um stabile Zelllinien herzustellen, wurden Flag-markierte
15 dominant negative (DN) Formen von Pycard (AS 1 bis 94, entsprechend der Pyrin-Domäne) in MSCV Puromycin-selektierbare retrovirale Vektoren (Clontech) kloniert und ein rekombinantes Virus wurde erhalten und nach Transfektion von 293T-Zellen in Kombination mit einem
20 Vektor, enthaltend die viralen Strukturgene (VSV-G "Pseudotyping" Vektor), titriert. THP.1-Zellen wurden infiziert, mit Puromycin (5 μ g/ml) für die Dauer von 2 Wochen selektiert und die Zellpopulationen wurden auf die Proteinexpression, Caspase-1, Caspase-8 und IL-1 β -
25 Aktivierung hin analysiert.

Anlagen A1 bis A9

5

A1:

In pro-apoptotischen Signaltransduktionskaskaden wird die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Initiatoreinheiten, wie z.B. dem Todesrezeptor Fas, den verschiedenen Adaptorproteinen und den Caspasen in erster Linie durch drei strukturell verwandte Protein-Protein-Domänen, nämlich der Todesdomäne (DD), Todeseffektordomäne (DED) und der Caspaserekrutierungsdomäne (CARD), vermittelt. Im vorliegenden Fall wird der Nachweis erbracht, dass eine vierte verwandte Domäne, die Pyrindomäne (PYD) genannt, existiert. Die PYD wird in Pycin, einem Protein, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist, bei Pycard, einem Regulator der Etoposid-vermittelten Apoptose, bei einer Caspase vom Zebrafisch und in zwei neuen Proteinen (NALP1, NALP2), die strukturell mit dem Apoptose-Regulationsprotein Card4/Nod1 verwandt sind, beobachtet. Für die PYD-Domäne von Pycard wurde nachgewiesen, dass sie homodimerisiert und mit PYD von NALP1 interagiert. Die Identifizierung der PYD-Familienmitglieder kann hierbei zur kurzfristigen Charakterisierung von pro-apoptotischen und/oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen beitragen.

Einführung

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist ein wesentlicher Vorgang bei Tieren und Pflanzen, insbesondere für die Beseitigung von unerwünschten Zellen in einer geordneten Art und Weise. Während der letzten Jahre ist ein erheblicher Fortschritt bei der Identifizierung und Charakterisierung der modularen Natur von Molekülen, die für die Regulation und Exekution der Apoptose verantwortlich sind, erzielt worden (Aravind et al., 1999, Hofmann, 1999). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass drei Familien von Homologiedomänen, die Todesdomäne (DD), die Todeseffektordomäne (DED) und die Caspaserekrutierungsdomäne (CARD) existieren, die entfernt miteinander verwandt sind, und eine Superfamilie von „Sechs-Helix-bundle“-Proteininteraktionsdomänen bilden. Bei diesen Domänen ist insbesondere wichtig, dass sie hochspezifische Wechselwirkung mit Mitgliedern der gleichen Subfamilie ausüben und in den meisten Fällen auch eine Rolle beim Signaltransduktionsprozess, der zur

Apoptose und/oder Entzündung führt, spielen. Im Besonderen ist zu beachten, dass die „Adaptorebene“ von Proteinen, die nämlich die Todesrezeptorsignale zu den Caspasen transportieren, stark mit Proteinen besetzt ist, die Kombinationen von Domänen von DD/DED/CARD aufweisen. Aufgrund der großen Bedeutung und der Vorhersagbarkeit ihrer Funktion sind mehrere systematische Suchen nach neuen Proteinen, die diese Domänen enthalten, erfolgreich durchgeführt worden. Hierdurch wurde die Entdeckung von Proteinen wie FLIP, CARDIAK/RIP2, ARC, Bcl10, DEDD (Irmeler et al., 1997; Koseki et al., 1998; McCarthy et al., 1998; Stegh et al., 1998, Thome et al., 1999) möglich. Im folgenden berichten wir von der Entdeckung einer neuen Domänenart, die im folgenden PYD (Pyrindomäne) genannt wird. Diese kann als vierte Subfamilie innerhalb der „Sechs-Helix-„bundle“-Interaktionsdomänen“ bezeichnet werden, nämlich aufgrund von Sequenzhomologien, Strukturvorhersage und Interaktionseigenschaften.

15

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Identifizierung einer neuen Domäne: Die Pyrin-Domäne

Im Zuge der Analyse der Sequenz des kürzlich identifizierten Proteins Pycard mit einer CARD-Domäne (PYD und CARD enthaltendes Protein), das auch als ASC („Apoptose-assoziiertes Speckle-ähnliches Protein“) bekannt ist, wurde realisiert, dass die zweite strukturelle Domäne, die am N-Terminus von Pycard (Pyrindomäne, PYD) auftritt, eine schwache, aber signifikante Sequenzhomologie zu einer Vielzahl anderer Proteine (Figur 1A) aufweist. Pycard ist ein 22-kDa-Protein, das Aggregate bildet, sobald die Apoptose durch gewisse Antitumorsubstanzen induziert wird (Masumoto et al., 1999).

25

Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei Zellen, die dazu gezwungen wurden, reduzierte Mengen von Pycard zu exprimieren, die Etoposid-vermittelte Apoptose gleichfalls signifikant unterdrückt ist. Unter Verwendung von PYD von Pycard ergab eine einfache BLAST-Suche, dass zwei zusätzliche PYD-enthaltende Proteine in der Sequenzdatenbank enthalten sind, nämlich Pyrin und Caspy. Pyrin wurde anfänglich als Produkt des MEFV (Mittelmeerfieber)-Gens identifiziert, das bei Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber mutiert ist (FrenchFMFConsortium, 1997;

30

InternationalFMFConsortium, 1997), ein erbliches periodisches Fiebersyndrom, das durch episodisches Fieber und serosale und synoviale Entzündung charakterisiert ist. Der Erkenntnisstand im Hinblick auf Pyrin basiert im wesentlichen auf seiner Domänenstruktur, die, zusätzlich zur PYD-Domäne, auch einen B-Box-Zinkfinger und eine „Spry“-Domäne aufweist (Figur 1B). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Pyrin ein Mitglied der RoRet-Genfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren ist, was Anlaß zur Spekulation gab, dass das Protein als ein transkriptionaler Inflamationsregulator (Centola et al., 1998) fungiert. Neuere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass Pyrin in Zytosol lokalisiert ist und keine nachweisbare transkriptionale Aktivität aufweist (Chen et al., 2000; Tidow et al., 2000). Daher ist die genaue Funktion von Pyrin bei inflammatorischen Krankheiten immer noch ungeklärt.

Auf der Basis der PYD-Sequenz dieser beiden Proteine wurde ein allgemeines PYD-Profil erstellt (Bucher et al., 1996) und in den nachfolgenden Suchschritten in der EST-Datenbank eingesetzt. Zwei zusätzliche PYD-enhaltende Proteine NALP1 und NALP2 (NACHT; LRR und PYD-enhaltende Proteine) wurden identifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass die NALPs eine PYD-, NACHT- und LRR-modulare Organisation aufweisen (Figur 1A, B). Die NACHT- und LRR-Domänenarchitektur wird bei Proteinen aufgefunden, die an der Inflammation oder Apoptose beteiligt sind, insbesondere bei CARD4/Nod1 (Figur 1B), ein NF- κ B-induzierendes Molekül (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999), einem neuronalen Apoptose-Inhibitor-Protein, NAIP, und dem MHC Klasse II-Transkriptionsaktivator, CIITA (Koonin und Aravind, 2000). Interessanterweise ist die Domäne PYD von NALP2 durch CARD bei CARD4/Nod1 ausgetauscht, während die strukturelle Gesamtorganisation konserviert ist, was eine ähnliche Funktionalität vermuten lässt (Figur 1B). CASPY ist ein PYD- und Caspasedomäne enthaltendes Protein, das anfänglich mit einer Datenbanksuche nach Zebrafisch-Homologen von Apoptoseregulatoren von Säugern (Inohara und Nunez, 2000) identifiziert wurde. Diese Caspase ist am stärksten homolog zur Caspase-13, die beim Menschen CARD anstelle von PYD enthält. Beachtenswert ist, dass die gleiche Untersuchung ein Pycard-verwandtes Protein bei Zebrafischen identifiziert hat, was eine hohe evolutionäre Konservierung dieser Proteine indiziert (Figur 1A).

Die Pyrin-Domäne ist verwandt mit der DD-Familie

Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurde vorgeschlagen, dass die Domänen DD, DED und CARD strukturell verwandte Protein-Proteininteraktionsmodule darstellen (Hofmann et al., 1997). Alle drei Domänenarten haben eine ähnliche Größe und die Sekundärstruktur-analyse ergab eine ähnliche Anordnung der sechs α -Helices. Alle drei Domänen teilen also die Eigenschaft, Homo- oder Heterodimere bilden zu können, und sind außerdem hochkonserviert (Hofmann et al., 1997). Die Strukturvorhersage wurde später durch NMR-Analyse der DDs, DEDs und CARDS (Chou et al., 1998; Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou et al., 1999) bestätigt, da die strukturelle Topologie dieser Domänen sich als sehr ähnlich erwies, insbesondere im Hinblick auf den strukturellen Kern, der durch die Helices $\alpha 2$ bis $\alpha 5$ gebildet wird (Figur 2). Einschließlich der PYD-enthaltenden Sequenzen in einem allgemeinen „Alignment“ gegenüber DED, CARD und DD, wurde erfindungsgemäß die PYD-Domäne als ein potentiell viertes Glied der „DD-gefalteten“ Superfamilie identifiziert (Figur 2).

Trotz der Ähnlichkeit ihrer Faltung ist bekannt, dass DD, DED und CARD ausschließlich, mit Mitgliedern der eigenen Subfamilie interagieren, so dass keine Promiskuität zwischen den Domänen festgestellt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die PYDs die gleichen Eigenschaften aufweisen, wurden Expressionsvektoren für die PYD-Proteine erzeugt, und in Ko-Immunopräzipitationsexperimenten auf ihre Eigenschaft, mit anderen Proteinen zu interagieren, getestet. Wie in Figur 3 dargestellt, wurde eine spezifische Bindung von Pycard mit den PYDs von Pycard und NALP1 detektiert, wenn eine Koexpression mit einem VSV-markierten Pycard, Flag-markierten Konstrukten enthaltend die PYD von Pycard oder die PYD von NALP1 ausgeführt wurde. Keine Interaktionen der PYD von Pycard mit anderen PYDs oder mit DDs, CARDS oder DEDs (Figur 3) wurden nachgewiesen. Daher ist die PYD-Domäne eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die spezifisch mit PYD-Domänen interagiert.

Pycard mit seiner PYD-CARD zweigeteilten Domänenorganisation erinnert an das DD und DED enthaltende Molekül FADD oder das DD und CARD enthaltende Protein RAIDD. Für beide Proteine ist bekannt, dass sie ein DD enthaltendes Protein mit einem

- eine DED- oder CARD-Domäne enthaltenden Protein adaptieren. Beispielsweise erfordert die DD von Fas FADD, um an die DED von Caspase-8 zu binden. Unsere Resultate lassen vermuten, dass Pycard ein neues Adaptormolekül darstellt, das NALP1 an ein noch unbekanntes und zu definierendes CARD-enthaltendes Protein koppelt. Tatsächlich zeigen erste Resultate, dass die CARD von Caspase-5 die Zielstruktur von Pycard-CARD ist. Die physiologische Rolle dieser Interaktion wird zur Zeit noch untersucht.
- 10 Zusammenfassend ist festzustellen, dass wir PYD als ein neues Protein-Protein-Interaktionsmodul identifiziert haben, das alle Kriterien eines Mitglieds der DD-Faltungsfamilie erfüllt. Vergleichbar zur beschränkten Interaktions-Fähigkeit, die für andere Mitglieder gilt, interagieren PYDs nur mit PYDs und nicht mit Mitgliedern der drei anderen Subfamilien. Darüber hinaus werden PYDs im Zusammenhang mit
- 15 Proteinen, die an der Apoptose und der Inflammation beteiligt sind, gefunden, was am besten durch die Caspase Caspy belegt ist. Regelmäßig treten PYDs zusammen mit CARDS, wie z.B. bei NALP1 und Pycard, auf. Die Identifizierung der neuen, PYD-enthaltenden Proteine ermöglicht daher wahrscheinlich die Charakterisierung von neuen pro-apoptotischen oder pro-inflammatorischen Signaltransduktionswegen, wie es auch
- 20 der Fall war nach der Identifizierung der DD von Fas vor einigen Jahren (Itoh und Nagata, 1993). Wir glauben, dass die Charakterisierung von NALP1 und dem Pycard-Komplex bereits der erste Schritt in diese Richtung ist, was schließlich zu einem besseren Verständnis der molekularen Ursachen von inflammatorischen Krankheiten führen wird.

25

METHODEN

Sequenz- und Strukturanalyse

- 30 Die Blast- und Profile-Algorithmen wurden verwendet (Bucher et al., 1996), die auf dem ISREC-Server (www.isrec.isb-sib.ch) verfügbar sind. Die Sekundärstruktur wurde nach den Algorithmen von Rost und Sander (1993) vorhergesagt.

Klonierung, Expression und Immunopräzipitation

Pycard-Konstrukte wurden durch PCR aus den folgenden IMAGE EST-Klonen
5 amplifiziert:

AA528254 (965955) und AI148558 (1714818). Pycard wurde amplifiziert mit den
folgenden Primern: JT1509 5'-ATGGGCGCGCGCGCGAC-3' und JT1512 5'-
TCAGCTCCGCTCCAGG-3'. Die PYD-Domäne von Pycard wurde amplifiziert mit
10 JT1509 und JT1510 5'-CGACTGAGGAGGGGCC-3'.

NALP1-Konstrukte wurden amplifiziert durch PCR unter Verwendung des KIAA0926
EST-Klons aus dem Kazusa DNA Forschungsinstitut als „Template“. NALP1-PYD
wurde amplifiziert mit JT1497 5'-
15 ATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTGGCCTGTTACTTG-3' und JT1525 5'-
GATCCAGGGCATTAGCAC-3', NALP1-CARD wurde amplifiziert mit JT1500 5'-
GTTGATACTTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAG-3' und JT1527 5'-
GATGAGACTCTGGTGTGG-3'.

20 Amplifizierte Schnitt-Fragmente wurden in PCR-Zero-Blunt (Invitrogen) ligiert und
anschließend in die EcoR1-Schnittstelle von VSV oder Flag-enthaltenden PCR-3
(Invitrogen) abgeleiteten Vektoren (Thome et al., 1999) subkloniert. Andere
Konstrukte, die verwendet wurden, entsprachen jenen, die bereits zuvor beschrieben
worden sind (Thome et al., 1999) subkloniert.

25

Die Immunopräzipitierung wurde, wie zuvor beschrieben (Burns et al., 1998),
durchgeführt. Kurz zusammengefasst, 293 T-Zellen wurden in DMEM-Medium, das
mit 10%igem fötalen Kälberserumglutamin angereichert war, kultiviert, in einem
Bereich von $1-3 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm-Platte ausgesetzt und mit 3 µg der indizierten
30 Konstrukte am nächsten Tag durch die Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode
transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und in Lysepuffer lysiert (0,2% NP40, 150 mM
NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,4) 24-26 Stunden nach der Transfektion. Die
Zell-Lysate wurden für mindestens 3 Stunden auf Sepharose 6B (Pharmacia)

vorgereinigt, und zwar vor der Fällung von einer gleichen Menge von Proteinen bei 4°C für vier Stunden mit 3 µl von Flag-Agarose (Kodak International Biotechnology) und 3 µl von Sepharose 6B-Perlen. Das Resin wurde 6x in Lysepuffer gewaschen und nach
5 dem letzten Waschschrift wurden die gebundenen Proteine durch Kochen in Probenpuffer eluiert, durch SDS-Page separiert und auf Nitrocellulose (Hybond ECL, Pharmacia) für das nachfolgende Western-Blotting transferiert. Sowohl Anti-VSV- und Anti-Flag-Antikörper wurden von Sigma gekauft. Ein HRP-konjugierter Antikörper, der
10 spezifisch die schwere Kette von IgG1 der Maus (Southern Biotechnology Associates) detektieren konnte, wurde eingesetzt.

Referenzen

- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *TIBS*, 24, 47-53.
- Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., Glucksmann, M.A. and DiStefano, P.S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 12955-8.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. and Hofmann, K. (1996) A flexible search technique based on generalized profiles. *Computer Chem.*, 20, 3-24.
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L. and Tschopp, J. (1998) MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, 273, 12203-12209.
- Centola, M., Aksentijevich, I. and Kastner, D.L. (1998) The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1581-8.
- Chen, X., Bykhovskaya, Y., Tidow, N., Hamon, M., Bercovitz, Z., Spirina, O. and Fischel-Ghodsian, N. (2000) The familial mediterranean fever protein interacts and colocalizes with a putative Golgi transporter. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 224, 32-40.
- Chou, J.J., Matsuo, H., Duan, H. and Wagner, G. (1998) Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*, 94, 171-80.

- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J. and Fesik, S.W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392, 941-5.
- FrenchFMFConsortium. (1997) A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat. Genet.*, 17, 25-31.
- Hofmann, K. (1999) The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55, 1113-28.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 155-156.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 384, 638-41.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. and Nunez, G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274, 14560-7.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2000) Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ*, 7, 509-10.
- InternationalFMFConsortium. (1997) Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell*, 90, 797-807.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., St inner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and

- Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.*, 268, 10932-7.
- Koonin, E.V. and Aravind, L. (2000) The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *TIBS*, 25, 223-4.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. and Nunez, G. (1998) ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5156-60.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T. and Sagara, J. (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 33835-8.
- McCarthy, J.V., Ni, J. and Dixit, V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 16968-16975.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Secondary structure prediction of all-helical proteins in two states. *Protein Eng.*, 6, 831-6.
- Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T.G., Grummt, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.*, 17, 5974-86.

Thome, M., Martinon, F., Hofmann, K., Rubio, V., Steiner, V., Schneider, P.,

Mattmann, C. and Tschopp, J. (1999) Equine herpesvirus-2 E10 gene product, but not its cellular homologue, activates NF-kappaB transcription factor and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, 274, 9962-8.

Tidow, N., Chen, X., Muller, C., Kawano, S., Gombart, A.F., Fischel-Ghodsian, N. and Koeffler, H.P. (2000) Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood*, 95, 1451-5.

Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999) Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11265-70.

FIGURLEGENDEN

Fig. 5 (A) Multiple Ausrichtung (Alignment) der Pyrin-Domäne. Position mit mehr als
5 50% identischen oder ähnlichen Aminosäuren sind auf schwarzem bzw. grauem
Hintergrund dargestellt. Die Speziesabkürzung ist wie folgt: HS, Homo sapiens und
DR, Danio rerio. Genebank/EMBL Zugangsnummern sind: AF310103 für humanes
Pycard, AF310104 für murines Pycard, O15553 für Pyrin, AF310105 für NALP1;
AF310106 für NALP2, AAF66964 für Zebrafisch CASPY, AAF66956 für Zebrafisch
10 Pycard. (B) Domänenstruktur der Proteine, die eine Pyrin-Domäne enthalten.
Homologie-Domänen werden wie folgt benannt: PYD für Pyrin-Domäne, CARD für
Caspase Recruitment Domain; NACHT für NAIP, CIITA, HET-E und TP1-Domäne;
LRR für Leucine-Rich Repeats, SPRY für Domäne beim SPla und Ryanodine-
Rezeptor. B für B-Box. (C) Aminosäuresequenz von NALP1. Die verschiedenen
15 Schattierungen der Boxen entsprechen den Domänen wie in Figur 1B (4B) gezeigt.

Fig. 6 Ausrichtung der repräsentativen Pyrin-Domänen (PYD), Todeseffektordomänen
(DED), Caspaserekrutierungsdomänen (CARD) und Todesdomänen (DD); diese zeigt
die Ähnlichkeit dieser Interaktionsdomänen. α -Linien indizieren die vorhergesagten α -
20 Helices für PYD (Rost und Sander, 1993) und die indizierten α -Helices bei den DD-,
CARD-, bzw. DED-Lösungsstrukturen (Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996; Zhou
et al., 1999)

Fig. 4 Pycard homodimerisiert mit Hilfe seiner PYD und interagiert mit PYD von
25 NALP1. Flag-markierte Konstrukte enthalten: PYD von Pycard (Pycard-PYD), RAIDD,
CARD von Apaf-1 (Apaf1-CARD), PYD von NALP1 (NALP1-PYD), CARD von
NALP1 (NALP1-CARD) und ein leerer Vektor (Mock-Vektor) wurden in 293 T-Zellen
mit einem VSV-markierten Pycard-Konstrukt-kotransfiziert. Die Zellen wurden 24
Stunden nach Transfektion lysiert und die Anti-Flag-Immunopräzipitate wurden im
30 Hinblick auf die Gegenwart von einem VSV-Pycard analysiert. Die Expression der
verschiedenen Konstrukte wurde in den Zell-Lysaten (untere Darstellung) analysiert.

Ansprüche

5

1. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit mindestens einer PYD-Domäne codiert, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Fragmente oder Allele.
10
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Signifikanzniveau von $p < 10^{-2}$ ergibt, wenn die PYD-Domäne der DNA-Sequenz mit einem Suchprofil nach Figur 3 verglichen wird.
15
3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), wie in Figur 6 wiedergegeben, einschließlich aller funktionshomologen Derivate, Allele oder Fragmente, enthält.
20
4. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine der in Figur 1 angegebenen (c)DNA-Sequenzen enthält.
25
5. DNA-Sequenz nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß deren Genprodukt eine der in Figur 1 angegebenen Aminosäuresequenzen enthält.
30
6. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.
35

7. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert ist.
- 5 8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Säugetierzelle, insbesondere eine humane Zelle, ist.
- 10 9. Aufgereinigtes Genprodukt, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 codiert wird.
- 15 10. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polypeptid ist.
11. Aufgereinigtes Genprodukt nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der in Figur 7 angegebenen Aminosäuresequenzen (für eine PYD-Domäne), einschließlich aller funktionshomologen Allele, Fragmente oder Derivate enthält.
- 20 12. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop auf einem Genprodukt nach einem der Ansprüche 9 bis 11 erkennt.
- 25 13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
- 30 14. Antikörper nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen einen Sequenzabschnitt auf der PYD-Domäne als Epitop gerichtet ist.

15. Verfahren zur Isolierung von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen nach Anspruch 7 oder 8 unter geeigneten, die Expression fördernden Bedingungen kultiviert werden und das Genprodukt schließlich aus der Kultur aufgereinigt wird.
16. Verfahren zur Expression von Genprodukten mit mindestens einer PYD-Domäne, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert werden.
17. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines Genprodukts nach einem der Ansprüche 9 bis 11 zur Behandlung von Erkrankungen, die auf fehlgesteuerter intrazellulärer Signaltransduktion beruhen.
18. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um eine solche mit einer überschießenden Entzündungsreaktion handelt.
19. Verwendung einer DNA-Sequenz oder eines Genprodukts nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung um Psoriasis, Artherosklerose, bakterielle oder virale Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie, multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma, Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder Osteoarthritis handelt.
20. Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß sie die spezifische Interaktion von PYD-Domänen zur intrazellulären Signalweiterleitung blockiert.

21. Verbindung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine organisch-chemische Verbindung mit
einem Molekulargewicht von vorzugsweise < 3000 ist.
- 5
22. Verbindung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet,
daß sie die Zellmembran durch Diffusion oder über
membranöse Transportproteine passiert.
- 10
23. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 20 oder 21
zur Behandlung von (bzw. zur Herstellung eines
Arneimittels zur Behandlung von) Psoriasis,
Artheriosklerose, bakterielle oder virale
15 Infektionserkrankungen, insbesondere bakterielle
oder virale Meningitis oder bakterielle Pneumonie,
multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Asthma,
Sarkoidose, glomeruläre Nephritis oder
Osteoarthritis.
- 20
- 25

Fig. 1

1.4

>Pyc.hs

MGTKREAILKVLLENLTPEELKKFKMKLGTVPPLREGFERIPRGALGQLD
IVDLTDKLVASYEDYAAELVVAVLDRDMRMLEEAARLQRAA

>Pyc.cdna

AGGAAAGGTAGGACCTGATGGCTCCAGGCCCTCGGAGGCTCAGAGGCGCAG
GGCTGAGCCATGGGAACGAAGCGCGAGGCCATCCTGAAGGTGCTGGAGAAC
CTGACACCGGAGGAGCTCAAGAAGTTCAAGATGAAGCTGGGGACGGTGCCG
CTGCGCGAGGGCTTCGGGCGCATCCCGCGGGGCGCGCTCGGGCAGCTAGATA
TCGTGGACCTCACCGACAAGCTGGTTCGCCTCCTACTACGAGGACTACGCAGC
CGAGCTCGTCGTGGCCGTGCTGCGCGACATGCGCATGTTGGAGGAGGCCGCA
CGGCTGCAGCGGGCTGCGTGAGGGCCACTCTGAGCTGGAGGCGGGTCAAGG
CAAAAGGAGTAATGCAACGCCTGTGAAGCCAGCCCCACGCGCGCACCAGTC
GCGTAAGACAACAGCAGTGTCTCCACCTCGGGGACCAAGGACGCCTCCGTGC
CTCCAGACCCCGCCTCCTCCAGCCCCTGCACCTGTCAATTTATTCTTCCACTGCC
CAATAAATATTCATGGCAGACTTTAAAAAAAAAA

1.2

>Pyrin

MAKTPSDHLLSTLEELVPYDFEFKFKLQNTSVQKEHSRIPRSQIQRARPVKMATLLVTTYGEEYAVQLT
LQVLRRAINQRLLAELHRAAIQEYSTQENGTTDDSAASSSLGENKPRSLKTPDHPEGNEGNGPRPYGGGAA
SLRCSQPEAGRGLSRKPLSKRREKASEGLDAQKPRTRSPALPGGRSPGPCRALEGGQAEVRLRRNASSA
GRLQGLAGGAPGQKECRPFVYLP SGKMRPRSLEVTTSTGEKAPANPEIILLTLEEKTAANLDSATEPRAR
PTPDGGASADLKEGPGNPEHSVTGRPPDTAASPRCHAQEGDPVDGTCVRDSCSFPEAVSGHPQASGSRSP
GCPRCQDSHERKSPGSLSPQPLPQCKRHLKQVQLLFCEHDDEPILICSLSQEHQGHVRPPIEEVALEHK
KKIQKQLEHLKKLRKSGEEQSRSYGEEKAVSFLKQTEALKQVRQKLEQVYVYFLEQQEHFFVASLEDVGM
VGQIRKAYDTRVSQDIALLDALIGELEAKECQSEWELLQDIGDILHRAKTVFPVEKWTTPQEIQKQQLL
HQKSEFVEKSTKYFSETLRSEMEMFNVP ELIGAQAHAVNVILDAETAYPNLI FSDDLKSVRLGNKWERLP
DGPQRFDSCLIVLGSFSLSGRRYWEVEVGDKTAWILGACKTISRKGNMTLSPENGYWVIMMKENEYQ
ASSVPPTRLLIKEPPKRVGIFVDYRVGSISFYNTARSHIYTFASCFSFSGPLQPIFSPGTRDGGKNTAPL
TICPVGGQGP

>Pyrin.cdna

GGAAGCCAGACAGCTGGCTCGAGCCTCTCCTGCTCAGCACCATGGCTAAGACCCCTAGTGACCATCTGCT
GTCCACCTTGGAGGAGCTGGTGCCCTATGACTTCGAGAAGTTCAAGTTCAAGCTGCAGAACACCAGTGTG
CAGAAGGAGCACTCCAGGATCCCCCGAGCCAGATCCAGAGAGCCAGGCCGGTGAAGATGGCCACTCTGC
TGGTCACTACTATGGGGAAGAGTACGCCGTGCAGCTACCCCTGCAGGTCTCGCGGGCCATCAACCAGCG
CCTGCTGGCCGAGGAGCTCCACAGGGCAGCCATTGAGGAATATTCACACAAGAAAACGGCAGAGATGAT
TCCGAGCGTCCAGCTCCCTGGGGGAGAACAGCCAGGAGCCTGAAGACTCCAGACACCCCGAGGGGA
ACGAGGGGAACCGCCCTCGGCCGTACGGGGCGGAGCTGCCAGCCTGCGGTGCAGCCAGCCCGAGGCCGG
GAGGGGGCTGTGAGGAAGCCCTGAGCAAACGCAGAGAGAAGGCCTCGGAGGGCCTGGACGCGCAGGGC
AAGCCTCGGACCCGAGCCCGGCCCTGCGGGCGGAGAGCCCGGCCCTGAGGGCGCTAGAGGGGG
GCCAGGCCGAGGTCCGGCTGCGCAGAAACGCCAGCTCCGCGGGGAGGCTGCAGGGCTGGCGGGGGCGC
CCCGGGGCGAGAAGGAGTGCAGGCCCTTCGAAGTGTACCTGCCCTCGGGAAGATGCGACCTAGAAGCCTT
GAGGTCAACCATTTCTACAGGGGAGAAGGCCCGCCGCAAATCCAGAAATTTCTCCTGACTTAGAGGAAAAGA
CAGCTGCGAATCTGGACTCGGCAACAGAACCCCGGGCAAGGCCCACTCCGGATGGAGGGGCATCTGCGGA
CCTGAAGGAAGGCCCTGGAAATCCAGAACATTCGGTCAACCGGAAGGCCACCAGACA CGGCTGCGAGTCCC
CGCTGCCACGCCAGGAAGGAGACCCAGTTGACGGTACCTGTGTGCGTGATTCTCTGCAGCTTCCCGAGG
CAGTTTCTGGGCACCCCCAGGCCCTCAGGCAGCCGCTCACCTGGCTGCCCCCGGTGCCAGGACTCCCATGA
AAGGAAGAGCCCGGAAGCCCTAAGCCCCCAGCCCCCTGCCACAGTGTAAAGCGCCACTGAAGCAGGTCCAG
CTGCTCTTCTGTGAGGATCACGATGAGCCCATCTGCCTCATCTGCAGTCTGAGTCAGGAGCACCAGGCC
ACCGGGTGCGCCCATTTGAGGAGGTGCGCCCTGGAACACAAGAAGAAATTCAGAAGCAGCTGGAGCATCT

Forts. Fig. 1

GAAGAAGCTGAGAAATCAGGGGAGGAGCAGCGATCCTATGGGGAGGAGAAGGCAGTGAGCTTTCTGAAA
CAAAC TGAAGCGCTGAAGCAGCGGGTGCAGAGGAAGCTGGAGCAGGTGTACTACTTCTGGAACAGCAGG
AGCATTTCTTTGTGGCCTCACTGGAGGACGTGGGCCAGATGGTTGGGCAGATCAGGAAGGCATATGACAC
CCGCGTATCCAGGACATCGCCCTGCTCGATGCGCTGATTGGGGAAC TGGAGGCCAAGGAGTGCCAGTCA
GAATGGGAAC TTTCTGCAGGACATTGGAGACATCTTGCACAGGGCTAAGACAGTGCCCTGCCCTGAAAAGT
GGACCAC TCTCTCAAGAGATAAAACAAAAGATCCAAC TCTCCACCAGAAATCAGAGTTTGTGGAGAAGAG
CACAAAGTACTTCTCAGAAACCTGCGTT CAGAAATGGAAATGTTCAATGTTCCAGAGCTGATTGGCGCT
CAGGCACATGCTGTTAATGTGATTCTGGATGCAGAAACCGCTTACCCCAACCTCATCTTCTCTGATGATC
TGAAGAGTGT TAGACTTGGAAACAAGTGGGAGAGGCTGCTGATGGCCCGCAAAGATTTGACAGCTGTAT
CATTGTTCTGGGCTCTCCGAGTTTCTCTCTGGCCCGCGTTACTGGGAGGTGGAGGTTGGAGACAAGACA
GCATGGATCTTGGGAGCCTGCAAGACATCCATAAGCAGGAAAGGGAACATGACTCTGTGCCAGAGAATG
GCTACTGGGTGGTGATAATGATGAAGGAAAATGAGTACCAGGCGTCCAGCGTTCCCCCGACCCGCTGCT
AATAAAGGAGCCTCCCAAGCGTGTGGGCATCTTCTGTTGACTACAGAGTTGGAAGCATCTCCTTTTACAAT
GTGACAGCCAGATCCACATCTATACATTGCGCCAGCTGCTCTTTCTCTGGGCCCTTCAACCTATCTTCA
GCCCTGGGACACGTGATGGAGGGAAGAACACAGCTCCTCTGACTATCTGTCCAGTGGGTGGT CAGGGGCC
TGACTGAATGCCCAACACTGCATCTCTCTCTGCTTCTGGCCTTGATCTTGCATCTCACTCAATAGT
CAGGGAATGCCGACTAGGTGCTAGCTGCTATGGGAAATGCAAAAATAACAAAATAGTTACTGTGCCACG
GAGCCTACCCGATTATAGCAGAGGTAAGTTAGGAACGAACATGTTAGTCAATCCGGGTGAAGACATGTAC
TGATGACACACCATGGATTT CAGAGGAGGAAGTACGGAGTCGTTGCATAATCCGCCCTGGTGGGTGGCA
CTCTCAGGTGCTCCTGAACAGAAGATTTGGCCCTCATTTTCCCTCAGAACCCACCGCAAGGATATATGT
CCCTTGTGTTCTCTCTGCTTCTGTCTTGAGGATATGGGAAGCCTAGAGAAACGCAAGCAGATGGAATTGGG
ATAGAAGTATTTGTGTACCTGGATTAATGAATGATGATTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACCAATCTTGC
TCTGTGGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCAGGTTCAAGC
GATTCTCTGCGCTCAGCCTCCTGAGCAGCTGGGATTACAGGTGCGTGCCACCACACAGGCTGGTTTTCT
TGTATTTT TAGTAGAGACGGGGTTTCAACATGTTAGCCAGGCTGGTCTCGAATCCTGACCTCAGGTGA
TCCACCCGCTCAGCCTCCCAAGTGTCTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCCGGCTATGATTTCTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAAAGTTTTGCTCTTGTCAACCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGAATCTTGG
CTCACTGCAACCTCCGCTCCAGGTTCAAGAGATTCTCTGCGCTCAGCCTCCGAAGTAGCTGGGATTAC
AGGCGCCCGCCACATGCCCCGGCTAATTTTTTGCATTTTTTAGTAGACATGAGGTTTCATCATGTTGGCCA
GGCCGCTCTCAAACCTCTGACCTCAGGTGATGCACCCACCTCAGCCTCCCAAGTGCAAGGATTACAGGC
ATGAGCCACCATGCTGGCCATGATTTCTTAAGAGAATTGACTGGGCCCTCATGAATAAAAAAATTAGAAAA

1.3

>Pycard
MGRARDAILDALENLTAEELKKFKLLSVPLREGYGRIPRGALLSMDALDLTDKLVSFYLETYGABELTA
NVLRDMGLQEMAGQLQAATHQSSGAAPAGIQAPQSAKPLHFIDQHRAALIARVNTNVEWLLDALYGVK
LTDBQYQAVRAEPTNPSKMRKLFSTPAWNWTKDLLLLQALRESQSYLVEDLERS

>Pycard.cdna
GTCCAGGTTCCGCCCCGAGCCGACTTCTCTCTGGTGGCGGCTGCAGCGGGGTGAGCGGCGGCAGCGGC
CGGGGATCCTGGAGCCATGGGGCGCGCGCGACGCCATCCTGGATGCGCTGGAGAACCTGACCGCCGAG
GAGCTCAAGAAGTTCAAGCTGAAGCTGCTGTGCGTGGCGCTGCGCGAGGGCTACGGCGCGATCCCGCGG
GCGCGCTGCTGTCCATGGACGCTTGGACCTCACCGACAAGCTGGTCAGCTTCTACCTGGAGACCTACGG
CGCGAGCTCACCGCTAAGCTGCTGCGGACATGGGCCTGCAGGAGATGGCGGGCAGCTGCAGGCGGCC
ACGCACCAGGGCTCTGGAGCGCGCGAGCTGGGATCAGGCCCTCTCAGTGGCGAGCCAAGCCAGGCC
TGCATTTTATAGACACGACCGGGCTGCGCTTATCGCGAGGGTCAAAACGTTGAGTGGCTGCTGGATGC
TCTGTACCGGAAGGTCTGACGGATGAGCAGTACCAGGCAGTGGCGGGCGAGCCCAACCCAAGCAAG
ATGCGGAAGCTCTTCAATTTTCAACACGCTTGAAGTGGACCTGCAAGGACTTGCTCCTCCAGGCCCTAA
GGGAGTCCCAGTCTTACCTGGTGGAGGACCTGGAGCGGAGCTGAGGCTCCTTCCAGCAACACTCCGGTC
AGCCCCCTGGCAATCCCAACCAATCATCTGATCTTTTATACAAATATACGAAAAGCCAGCTT
GAAAAA

1.4

>NALP1.hs
MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSETPAQPEKTSMEVASYLVAQYGEQRAWDLA
LHTWEQMGLRSLCAQAQEGAGHSPSPFSPSEPHLGSPSQPTSTAVLMPWIHELPACTQGSERRVLRQL

Forts. Fig. 1

PDTSGRRWREISASHLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLGWSGSPQPQSLAPREQEAPGTQWPLDE
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHSSLOPHHPWEPSVRESLCSTWPKNEDFNQKFTQ
 LLLLQRPHPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGHLIEIRDLFGPGLDTQEPRIVILQGAAGIGKSTLARQVKEA
 WGRGQLYGDRFQHVFFSRELAQSKVVSALIELIGKGTATPAPIRQILSRPERLLFILDGVDEPGWVLQ
 EPSSELCLHWSQPQPADALLGSLGKTLILPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSRKEYF
 YRYFTDERQAIRAFRLVKSNNELWALCLVPVWSWLACTCLMQMKRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ
 AQPLGPQLRDLCSLAAEGIWQKTLFSPDDLKRGHLDGAIISTFLKMGILQEHPIPLSYSFTHLCFOEFF
 AAMSVLEDEKGRGKHSNCIIDLEKTLKAYGIHGLFGASTTRFLLGLLSDGEREMENI FHCRLSQGRNL
 MQWVPSLQLLLQPHSLSLHCLYETRNKTLFTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLIQLI
 EGRQHRSTWSPSMVVLFRWVPVTDAYWQILFSVLKVTNRNLKELDLGNSLSHSAVKSCKTLRRPRCLLE
 TLRLAGCGLTAEDCKDLAFGLRANQTLTELDLSFNVLMDAGAKHLQRLRQPSCKLQRLQLVSCGLTSDC
 CQDLASVLSASPSLKELDLQNNLDDVGVRLLCGLRHPACKLIRLGLDQTTLSDEMRQELRALEQEKFP
 LLIIPSRKPSVMTPIEGLDTGEMSNSTSSLRQRLGSERAASHVAQANLKLIDVSKI FPIAETAESSPE
 VVPVELLCVPSPASQDGLHTKPLGTDHDFWGPVTPVATEVVDKEKNLYRVHFFVAGSYRWNTGLCFVVR
 EAVTVIEIFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLLDIKAEFGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSIFQVAHFKEE
 GMLLEKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRLHPEEVTFLHYLIPSDCSIR
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLSGIRLQVKDKKDETLVWEALVKPGDLMPATTLIPACIAVPSPID
 APQLLHFVDQYREQLIARVTSVEVVDKLHGQVLSQEQYERVLAENTRPSQMRKLSLSQSWDRKCKDGL
 YQALKETHPHLIMELWEKSGSKGLLPLSS

>NALP1.cdna

TGGGAGCCAGCAGCCCGGGGCTCCACTCTGGGTTCTGAAAGCCCATTCCTGCTCTGCGGCTCCTCCCA
 CCCACCTCTTCTCAGCCTTGACGCTCAAGGTTGATCTCAGGAGTCCAGGACCCAGGAGAGGGAAGAT
 CTGAGGAACACAGAACAGATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCTGGCCTGTTACTTGAGATTCTCGAAG
 AAGGAGGAGCTGAAGGAGTTCAGCCTTCTGCTCGCCAATAAAGCGCACTCCAGGAGCTCTCGGGTGAGA
 CACCCGCTCAGCCAGAGAAGACGAGTGGCATGGAGGTGGCCTCGTACCTGGTGGCTCAGTATGGGGAGCA
 GCGGGCTGGGACCTAGCCCTCCATACCTGGGAGCAGATGGGGCTGAGGTCACTGTGCGCCCAAGCCAG
 GAAGGGGCAAGGCCACTCTCCCTCATTCCCTACAGCCCAAGTGAAACCCACCTGGGGTCTCCAGGCCAAC
 CCACCTCCACCGCAGTGCTAATGCCCTGGATCCATGAATTGCCGGCGGGGTGCACCCAGGGCTCAGAGAG
 AAGGTTTGTAGACAGCTGCCCTGACACATCTGGACCGCTGGAGAGAAATCTCTGCCCTCACACCTCTAC
 CAAGCTCTTCCAAGCTCCCGAGACCATGAGTCTCCAAGCCAGGAGTCAACCAACGCCCCCAATCCACAG
 CAGTGTCTGGGAGCTGGGGATCCCCACCTCAGCCAGCCTAGCACCCAGAGAGCAGGAGGCTCCTGGGAC
 CCAATGGCCTCTGGATGAACCGTCAGGAATTTACTACAGAAATCAGAGAAAGAGAGAGAGAGAAATCA
 GAGAAAGGCAGGCCCCCATGGGCAGCGGTGGTAGGAACGCCCCCAAGGCGCACAGCAGCCTACAGCCCC
 ACCACCAACCATGGGAGCCTTCTGTGAGAGAGAGCCTCTGTTCACATGGCCCTGGAAAAATGAGGATTT
 TAACCAAAATTCACACAGCTGCTACTTCTACAAGACCTCACCCAGAAAGCAAGATCCCCTGGTCAAG
 AGAAGCTGGCCCTGATTATGTGGAGAGAAATCGAGGACATTTAATTGAGATCAGAGACTTATTTGGCCAG
 GCCTGGATACCAAGAACCTCGCATAGTCATATGCGAGGGGCTGCTGGAATGGGAAGTCAACACTGGC
 CAGGCAGGTGAAGGAAGCCTGGGGAGAGGCCAGCTGTATGGGACCGCTTCAGCATGTCTTCTACTTC
 AGCTGCAGAGAGCTGGCCAGTCCAAGTGGTGAGTCTCGCTGAGCTCATCGGAAAGATGGGACAGCCA
 CTCGGGCTCCCATTAGACAGATCCTGTCTAGGCCAGAGCGGCTGCTCTTCATCCTCGATGGTGTAGATGA
 GCCAGGATGGGTCTTGACAGGACCGAGTTCTGAGCTCTGTCTGCACTGGAGCCAGCCACAGCCGCGGAT
 GCACTGCTGGGCAGTTTGCTGGGAAAACTATACCTCCGAGGCATCCTTTCTGATCACGGCTCGGACCA
 CAGCTCTGCAGAACCTCATTCTTTTGGAGCAGGCAGTGGGTAGAGGTCTGGGGTTCTCTGAGTC
 CAGCAGGAAGGAATATTTCTACAGATATTTACAGATGAAGGCAAGCAATTAGAGCCTTTAGGTTGGTC
 AAATCAAAACAAAGAGCTCTGGGCCCTGTGTCTGTGCCCTGGGTGTCTGGCTGGCCTGCATCTGCCTGA
 TGACAGCAGATGAAGCGGAAGGAAAACTCACACTGACTTCCAAGACCAACCAACCTCTGTCTACATTA
 CTTGCCCAGGCTCTCAAGCTCAGCCATTGGGACCCAGCTCAGAGACCTCTGCTCTCTGGCTGCTGAG
 GGATCTGGCAAAAAAGACCTTTTCACTCCAGATGACCTCAGGAAGCATGGGTTAGATGGGGCATCA
 TCTCCACCTTCTGAAGATGGGTATTCTTCAAGAGCACCCCATCCCTCTGAGCTACAGCTTCACTCACT
 CTGTTTCCAGGAGTTCTTTGAGCAATGTCTATGTCTTGAGGATGAGAAGGGGAGAGGTAACATTCT
 AATTGCATCATAGATTGGAAAAAGACGCTAGAAGCATATGGAATACATGGCCTGTTTGGGGCATCAACCA
 CACGTTTCTATTGGGCCTGTTAAGTGATGAGGGGGAGAGAGAGATGGAGAACATCTTTCACTGCCGGCT
 GTCTCAGGGGAGGAACCTGATGCAGTGGGTCCCTTCCCTCAGCTGTCTGCTGCAGCCACACTCTCTGGAG
 TCCCTCCACTGCTTGTATGAGACTCGGAACAAACGTTCCCTGACACAAAGTATGGCCATTTCTGAGAAA
 TGGGCATGTGTAGAAACAGACATGGAGCTCTTAGTGTGCACTTTCTGCATTAAATTCAAGCCGACGCT
 GAAGAAGCTTCACTGATTGAGGGCAGGCAGCAGATCAACATGGAGCCCAAGCATGGTAGTCTGTTTC
 AGGTGGGTCCAGTCACAGATGCCTATTGGCAGATTCTCTCTCGTCTCAAGGTCAACAGAAACCTGA

Ports. Fig. 1

AGGAGCTGGACCTAAGTGGAACCTCGCTGAGCCACTCTGCAGTGAAGAGTCTTTGTAAGACCTTGAGACG
CCCTCGCTGCCTCCTGGAGACCTGCGGTTGGCTGGCTGGCCCTCACAGCTGAGGACTGTAAGGACCTT
GCCTTTGGGCTGAGAGCCAACAGACCTGACCGAGCTGGACCTGAGCTTCAATGTGCTCATGGATGCTG
GAGCCAAACACCTTTGGCAGAGACTGAGACACCGAGCTGCAAGCTACAGCGACTGAGCTGGTCAAGCTG
TGGCCTCACGCTGAGCTGCTGCCAGGACCTGGCCTCTGTGCTTAGTGCCAGCCCCAGCCTGAAGGAGCTA
GACCTGCAGCAGAACAACCTGGATGACGTTGGCGTGCGACTGCTCTGTGAGGGGCTCAGGCATCCTGCCT
GCAAACTCATACGCTGGGCTGGACAGAGACTCTGAGTGATGAGATGAGGCAGGAGCTGAGGGCCCT
GGAGCAGGAGAAGCCTCAGCTGCTCATCTTCAGCAGACGGAAACCAAGTGTGATGACCCCTATTGAGGGC
CTGGATACGGGAGAGATGAGTAATAGCACATCCTCACTCAAGCGGAGAGACTCGGATCAGAGAGGGCGG
CTTCCCATGTTGCTCAGGCTAATCTCAAACCTCCTGGACGTGAGCAAGATCTTCCAATTGCTGAGATTGC
AGAGGAAAGCTCCCCAGAGGTAGTACCGGTGGAACCTTTGTGCGTGCCCTTCTCCTGCCTCTCAAGGGGAC
CTGCATACGAAGCCTTTGGGGAAGTACGATGACTTCTGGGGCCCCACGGGGCCTGTGGCTACTGAGGTAG
TTGACAAAGAAAGAACTTTGTAACGAGTTCACTTCCCTGTAGCTGGCTCCTACCGCTGGCCCCAACAGGG
TCTCTGCTTTGTGCTGAGAGAAGCGGTGACCGTTGAGATTGAATCTGTGTGTTGGGACCAAGTCTCTGGGT
GAGTCAACCCACAGCACAGCTGGATGCTGGCAGGGCCTCTGCTGACATCAAGGCTGAGCCTGGAGCCG
TGGAAGCTGTGCACCTCCCTCACTTTGTGGCTCTCAAGGGGGCCATGTGGACACATCCCTGTTCCAAGT
GGCCCACTTTAAAGAGGAGGGGATGCTCCTGGAGAAGCCAGCCAGGGTGGAGCTGCATCACATAGTTCTG
GAAAACCCAGCTTTTCCCCCTTGGGAGTCTCTGAAAATGATCCATAATGCCCTGCGCTTCATTCCCG
TCACCTCTGTGGTGTGCTTTACACCGCCTCCATCCTGAGGAAGTCACTTCCACCTCTACTGATCCC
AAGTGAAGTGTCCATTCCGAAGGAAGTGGAGCTCTGCTATCGAAGCCCTGGAGAAGACCAGCTGTTCTCG
GAGTTCTACGTTGGCCACTTGGGATCAGGATCAGGCTGCAAGTGAAGACAAGAAAGATGAGACTCTGG
TGTGGGAGGCTTGGTGAAGAACAGGAGATCTCATGCTGCAACTACTCTGATCCCTCCAGCCTGCATAGC
CGTACCTTCACTCTGGATGCCCCGAGTTGCTGCACTTTGTGGACCAATGATGAGAGCAGCTGATAGCC
CTGGCTGACATCGGTGGAGGTGTGCTTGGACAACTGCAATGGACAGGTGCTGAGCCAGGAGCAGTACGAGA
GGGTGCTGGCTGAGAACAGAGGCCAGCCAGATGCGGAAGCTGTTCAAGCTTGAGCCAGTCTCTGGGACCG
GAAGTGCAAGATGGAATCTACCAAGCCCTGAAGGAGACCCATCCTCACTCATTATGGAATCTCTGGGAG
AAGGGCAGCAAAAAGGGAAGTCTTGGCACTCAGCAGCTGAAGTATGAACACCAGCCCTTGACCCCTGAGTC
CTGGCTTTGGCTGACCCCTTCTTGGGTCTCAGTTTCTTCTCTGCAAAACAAGTTGCCATCTGGTTTGCCT
TCCAGCACTAAAGTAATGGAACCTTTGATGATGCTTTGTGCGGCATATGTGTCCATGCCAGGGATGCCA
CAGGGGGCCCCAGTCCAGGTGGCCTAACAGCATCTCAGGAATGTCCATCTGGAGCTGGCAAGACCCCTG
CAGACCTCATAGAGCCTCATCTGGTGGCCACAGCAGCCAGCCATAGAGCCCTCCGGATCCCATCCAGGCG
CAAGAGGAATAGGAGGACATGGAACCATTTGCCTCTGGCTGTGTACAGGGTGAGCCCCAAAATTTGGG
GTTGAGCTGGGAGGCCACGTGGATTCTTGGCTTTGTACAGGAAGATCTACAGGACCAAGCAACAGAGT
AAAGTGAAGGAAGTTTATTCAGAAAATAAAGGAGTATCACTGCTCTTTTAGAATTTGTCTAGCAGACTT
TCCAGTTTTTACCAGAAAACCCCTATAAATTAAAAATTTTACTTAAATTTAAGAATTAATAAAAAATACA
AAAAAGAAAAAATGAAAAATAAGGAATAAGAACTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAA

1.5

>NALP2/Py7.hs

MVSSAQMGFNLQALLEQLSQDELSKFKYLITTFSLAHELQKI PHKEVDKADGKQVEILTTHCDSYWVEMA
SLQVFEEKMRMDLSEKAKDEVREAAALKSFNKRKPLSLGITRKEPPLDVEMLERFKTEAQAFETETKGNVI
CLGKEVFGKGPDPKDNRCRYILKTKFREMWSWPGDSKEVQVMAERYKMLIPFSNPRVLPFPFSYTVVLVY
PAGLGKTTLAQKLMLOWAEDNLHKFKYAFYLSCRELSRLGPCSFAELVFRDWPQLDDIPHILAQARKIL
FVIDGFDELGAAPGALIEDICGDWEKKKPVFVLLGSLNVRVLPKALLVTRPRALRDLRLAEEPIYIR
VEGFLEEDRRAYFLRHFQDEDDQAMRAPELMRSNAALFQLGSAPAVCWIVCTTLKLQMEKGEDFVPTCLTRT
GLFLRFLCSRFPQGAQLRGALRTLSELLAAQGLWAQTSVLHREDLERLGVQESDLRLFLDGDILRQDRVSKG
CYSFIHLSFQQFLTALFYTLKEKEEEDRDGHTWDIGDVQKLLSGVERLRNPDLIAGYYSFGLANEKRAKE
LEATFGCRMSPDIKQELLRCDISCKGGHSTVTDLQELLGCLYESQEEELVKEVMAQFKEISHLNAVDVVP
SSFCVKHCRNLQKMSLQVIKENLPENVTASESDAEVERSQDDQHMLPFWTDLCSIFGSNKDMLGLAINDSF
LSASLVRILCEQIASDTCHLQRVVFKNISPADAHNLCIALRGHKTVTYTLQGNDDQDMFALCEVLRHP
ECNLRYLGLVSCSATTQOWADLSLAEVNQSLTCVNLSNELLDEGAKLLYTLRHPKCFQLRLSLENCHL
TEANCKDLAAVLVVSRELTHLCLAKNPIGNTVGVKFLCEGLRYPECKLQTLVLWNCDI TSDGCCDLTKLLQE
KSSLLCLDLGLNHIGVKMKFLCEALRKPLCNLRCLWLWGCSI PPFSCEDLCSALSCNQSLVTLDLGQNPL
GSSGVKMLFETLTCSSGTLRLTLRLKIDDFNDELNKLLEIEEKNPQLIIDTEKHPWAERPSSHDFMI

>NALP2Py7.dna

Forts. Fig. 1

EPRTVVMQ AAGIGKSMIA HKVMDWADG KLFQGRFDYL FYINCREMNO SATECSMODL
 IFSCWPEPSA PLOELIRVPE RLLFIIDGFD ELKPSFHDPQ GPWCLCWECK RPTELLINSL
 IRKKLLPELS LLITTRPTAL EKLHRLLEHP RHVEILGFSE AERKEYFYKY FHNAEQAGQV
 FNYVRDNEPL FTMCFVPLVC WVVCTCLQQQ LEGGELLRQT SRTTAVYML YLLSLMQPKP
 GAPRLQPPPN QRGCLSLAAD GLWNQKILFE EQDLRKHGLD GEDVSAFLNM NIFQKDINCE
 RYYSFIHLSF QEFFAAMYI LDEGEGGAGP DQDVTRILLTE YAFSERSFLA LTRFLFGLL
 NEETRSHLEK SLCWKVSPHI KMDLLQWIOS KAQSDGSTLO QGSLEFFSCL YEIQEEFFIQ
 QALSHFQVIV VSNIAKMEH MVSSFCCLKRC RSAQVLIHLYG ATYSADGEDR ARCSAGATL
 LVQLRPRTV LLDAYSEHLA AALCTNPNI ELSLYRNALG SRGVKLLCQG LRHPNCKLON
 LRLKRCRISS SACEDLSAAL IANKNLTRMD LSGNGVGFPG MMLLCEGLRH PQCRLOMIQL
 RKQLESAC QEMASVLGTN PHLVELDLTG NALEDLGLRL LCQGLRHPVC RLRTLWLKIC
 RLTAACDEL ASTLSVNQSL REIDLSLNEL GDLGVLLLC EGLRHPTCKLQ TLRIGICRLG
 SAACEGLSV LQANHLREL DLSFNDLGDW GLWLLAEGLO HPACRLQKLW LDSCGLTAKA
 CENLYFTLGI NQTLTDLYLT NNALGDTGVR LLCKRLSHPG CKLRVLWLFQ MDLNMKTHSF
 PEPLQPDVAV DLYPRQFPAG NRNHLRFSSC RRPSTASVD MGVTDGAQMS QHFPLGHQNS
 APHLRPTGQL REYVLNLSG

>NALP3/PY5.dna

atgctacgaacccgaggcagggacggcctctgtcgctgtccacctacttgaagaactc
 gaggtgtggaactgaagaagtcaagttatacctgggacccgacagagctgggagaa
 ggcaagatcccctgggaagcatggagaaggccggtcccctggaaatggcccagctgctc
 atcacccacttcgggcccagaggaggcctggaggttggtctcagcacctttgagcggata
 aacaggaaggacctgtgggagagaggacagagaggacctgggtgaggatccccaggaa
 acctacagggactatgtccgcaggaaattccggctcatggaagaccgcaatgcgcgccta
 ggggaatgtgtcaacctcagccacgggtacacccggctcctgctgggtgaaggagcactca
 aaccccatcagggtccagcagcagcttctggacacagggcgggacacgcgaggaccgtg
 ggacaccaggctagccccatcaagatagagaccctctttgagccagacgaggagcgcccc
 gagccaccgcacccgtggtcatgcaaggcgcggcagggataggcaagtcctatgtggca
 cacaaggtgatgtgtgactgggacgggagggaggtcttccaaaggcagatttgattatctc
 ttctacatcaactgcaggggagatgaaccagagtgccacggatgcagcatgcaagacctc
 atcttcagctgtgtgctgagcccgccgctctccaggagctcatccgaggttcccgag
 cgctcctcttccatcgcagcggcttcgatgagctcaagccttcttccacgatcctcag
 ggaccctggtgcctctgtgtgggaggagaaacggccacggagctgttcttaacagctta
 attcggaagaagctgtccttgagctatcttctgtcatcaccacacggccacggcttg
 gagaagctccaccgtctgtgtggagcaccacaggcatgtggagatcctgggcttctctgag
 gcagaaaggaaggaatacttctacaagtatttccacaatgcagagcagggcggaagtc
 ttcaattacgtgaggggacaacgagcctctcttccacatgtgtcttctccccctggtgtgc
 tgggtggtgtgtacgtgcctccagcagcagctggaggggtggggggtgttgagacagacg
 tccaggaccaccactgcagtgatcatgtctacctgctgagctgtgatgcaacccaagccg
 ggggccccgcgctccagccccacccaaccagagagggtgtgtccttggcggcagat
 gggtctggaatcagaaaaatcctatttgaggagcaggacctcgggaagcacggcctagac
 ggggaagacgtctctgccttctcaacatgaacatcttccagaaggacatcaactgtgag
 aggtactacagcttcatccacttgagtttccaggaattcttggcagctatgtactatctc
 ctggacgagggggaggggcggggcagggccagaccagagcgtgaccaggctgttgaccgag
 tacgcgtttctgaaaggagcttctggcactcaccagcgcttctgtttggactcctg
 aacgaggagaccaggaccacctggagaagagctctctgtggaaggtctcgccgcacatc
 aagatggacctgtgcagtggtatccaaagcaaagctcagagcgacggctccaccctgcag
 cagggctccttggagttcttcagctgctgtacgagatccaggaggaggaggttatccag
 cagggcctgagccacttccaggtgatcgtggtcagcaacattgctccaagatggagcac
 atggtctcctcgttctgtctgaagcgctgcaggagcgccagggtgctgcaactgtatggc
 gccacctacagcgaggacggggaagaccgcgcgaggtgctccgcaggagcgcacacgctg
 ttggtgcagctcagaccagagaggaccgttctgctggacgctacagtgaaacatctggca
 gcggccctgtgcaccaatccaaacctgatagagctgtctctgtaccgaaatgcctgggg
 agccgggggggtgaagctgctctgtcaaggactcagacaccccaactgcaaaactcagaac
 ctgaggtgaagaggtgcccgcattctccagctcagcctgcgaggacctctctgcagctctc
 atagccaataagaatttgacaaggatggatctcagtggaacggcgttggattcccaggc
 atgatgctgctttgcgagggcctgcggcatccccagtgaggctgcagatgattcagttg
 aggaagtgctcagctggaggtccgggcttctcaggagatggcttctgtgctcggcaccac

Forts. Fig. 1

ccacatctgggtgagttggacctgacaggaaatgcactggaggatttgggcctgaggtta
 ctatgccagggaactgagggcaccagctctgcagactacggactttgtggctgaagatctgc
 cgcctcactgctgctgctgtgacgagctggcctcaactctcagtgtgaaccagagcctg
 agagagctggacctgagcctgaatgagctgggggacctcggggtgctgctgctgtgtgag
 ggctcaggcatccacgtgcaagctccagacctgcggttgggcatctgcgggtgggc
 tctgcgcctgtgaggggtcttctgtggtgctccaggccaaccacaacctccgggagctg
 gacttgagtttcaacgacctgggagactggggcctgtggttgttggtgaggggctgcaa
 catccgcctgcagactccagaaactgtggctggatagctgtggcctcacagccaaggct
 tgtgagaatcttacttcacctggggatcaaccagaccttgaccgacctttacctgacc
 aacaaacgacctaggggacacaggtgtccgactgctttgcaagcggtgagccatctggc
 tgcaaacctccgagtcctctggttatttgggatggacctgaataaaatgaccacagttt
 ccggagccattacagccagacgtgtgaaggacctgtaccaagacagtttccggctggg
 aatcgaaaccacaggtctcttagttcctgcagaagaccgagctccacggcatccgtgat
 atgggctgacccggtgacgctcaaatgtcgagcactttccacttggacatcagaatagt
 gctccacatttggggccacagggccagctgcgggagtacgtgctcaacctttctggttaa

1.7

>NALP4/PY6.hs

MADSSSSSFFPDFGLLLYLEELNKEELNTFKLFLKETMEPEHGLTPWNEVKARREDLANLMKKYYPGEKA
 WSVSLKIFGKMNLDLCERAKSEINWSAQITIGPDDAKAGETQEDQEAVLIVNTGVPNSWATDPYWSAAPR
 ESGRIAGGDGTEYRNRIKEKFCITWDKSLAGKPEDFHHGLAEKDRKLLLEHLFDVDVKTGAQPQIVVLQGA
 AGVGKTTLVKAMLDWAEGSLYQORFKYVFLNGREINQLKERSFAQLISKDWPSTEGPIEEIMYQPSLL
 FIIDSFDELNFAPEEPEFALCEDWTQEHFVSFLMSSLLRKVMLPEASLLVTRLTTSKRLKQLLKNHNYVE
 LLGMSDAREEYIYQFFEDKRWAMKVFSSLSKNEMLFSMCQVPLVCWAACTCLKQOMEKGGDVTLTCQTTT
 ALFTCYISSLFTPDGSGSPSLPNQAQLRRLCQVAAGIWTMTYVYFRENLRRLGLTQSDVSSFMDSNIIQK
 DAHEYENCYVFTLHVQEFFAAMFYMLKGSWEAGNPSQPFEDLKSLLQSTSYKDPHLTQMKCFLFGLLNED
 RVKQLERTFNCKMSLKI KSKLLQCMFVLGNSDYSQSLGFLFELFHCLYETQDKAFISQAMRCFPKVAINIC
 EKIHLVSSFLKHCRCRLRTIRLSVTTVFEKKILKTSLPNTNWEWMGNRAIGQIRPLECPEEDFLVDCAH
 GGAALDALAFPKYTYFYSENTIL

>NALP4/Py6.dna

ATGGCAGATTTCATCATCATCTTCTTTCTTCTCTGATTTTGGGCTGCTATTGTATTGGAGGAGCTAAACAA
 AGAGGAATTAATAACATTCAAGTTATTCTTAAGGAGACCATGGAACCTGAGCATGGCCTGACACCCTGGA
 ATGAAGTGAAGAAGCCAGGCGGGAGGACCTGGCCAAATTGATGAAGAAATATTATCCAGGAGAGAAAGCC
 TGGAGTGTGTCTCTCAAATCTTTGGCAAGATGAACCTGAAGGATCTGTGTGAGAGAGCGAAAGAAGAGAT
 CAACTGGTGGGCCAGACTATAGGACCAGATGATGCCAAGGCTGGAGAGACACAAGAAGATCAGGAGGCAG
 TGCTGGTTCATAGTTAAACACAGGGGTCCCAACTCCTGGGCCACAGACCCCTACTGGTGGCGGGCCCTCGG
 GAATCAGGTGCGCATAGCAGGAGGTGATGGAACAGAATACAGAAATAGAATAAAGGAAAAATTTGCATCAC
 TTGGGACAAGAAGTCTTTGGCTGGAAAGCCTGAAGATTCCATCATGGAATTGCAGAGAAAGATAGAAAAC
 TGTGGAACACTTGTTCGATGTGGATGTCAAAAACGGGTGCACAGCCACAGATCGTGGTGTCTCAGGGAGCT
 GCTGGAGTTGGGAAAAACAACCTTGGTGAGAAAGGCAATGTTAGATTGGGCAGAGGGCAGTCTCTACCAGCA
 GAGGTTTAAAGTATGTTTTTTTATCTCAATGGGAGAGAAATTAACCAGCTGAAAGAGAGAAAGCTTTGCTCAAT
 TGATATCAAAGGACTGGCCCGACACAGAAGGCCCATTTGAAGAAATCATGTACCAGCCAAGTAGCCTCTTG
 TTTATTATTGACAGTTTCGATGAACTGAACTTTGCTTTGAAGAACCTGAGTTTGCACTGTGCGAAGACTG
 GACCCAAGAACACCCAGTGTCTTCTCATGAGTAGTTTGTGAGGAAAGTGATGCTCCTGAGGCATCCT
 TATTGGTGACAACAAGACTCACAACTTCTAAGAGACTAAAGCAGTTGTGAAGAATCACCATTATGTAGAG
 CTACTAGGAATGTCTGAGGATGCAAGAGAGGAGTATATTACCAGTTTGTGAAGATAAGAGGTGGGCCAT
 GAAAGTATTCACTTCACTAAAAAGCAATGAGATGCTGTTTAGCATGTGCCAAGTCCCCCTAGTGTGCTGGG
 CCGCTTGTACTTGTCTGAAGCAGCAATGGAGAAGGGTGGTGTATGTCACATTGACCTGCCAAAACAACCACA
 GCTCTGTTTACCTGTCTATATTCTAGCTTGTTCACACAGTAGATGGAGGCTCTCCTAGTCTACCCAACCA
 AGCCAGCTGAGAAGACTGTGCCAAGTCTGCTGCCAAGCAATATGGACTATGACTTACGTGTTTTACAGAG
 AAAATCTCAGAAGGCTTGGGTTAACTCAATCTGATGTCTTAGTTTTATGGACAGCAATATTATTAGAAAG
 GACGCAGAGTATGAAAACCTGCTATGTGTTACCCACCTTCATGTTTACGAGTTTGTGAGCTATGTTCTA
 TATGTTGAAGGCAGTTGGGAAGCTGGGAACCTTCTGCCAGCCTTTTGAAGATTGGAAGTCATTACTTC
 AAAGCACAAAGTTATAAAGACCCCATTTGACACAGATGAAGTGCTTTTGTGTTGGCCTTTGAATGAAGAT
 CGAGTAAACAACTGGAGAGGACTTTTAACTGTAAATGTCACTGAAGATAAAATCAAAGTTACTTCAGTG

Forts. Fig. 1

TATGGAAGTATTAGGAAACAGTGACTATTCTCCATCACAGCTGGGATTTCCTGGAGTTGTTTCACTGTCTGT
 ATGAGACTCAAGATAAAGCGTTTATAAGCCAGGCAATGAGATGTTTCCCAAAGGTTGCCATTAAATTTGT
 GAGAAAAATACATTTGCTTGTATCTTCTTTCTGCCCTTAAGCACTGCCGGTGTTCGGGACCATCAGGCTGTC
 TGTAACTGTGTTATTTGAGAAGAAGATATTAAAAACAAGCCTCCCACTAACACTTGGGAGTGGATGGGAA
 ACGGGAGAGCTATTGGACAAATAAGACCTCTGGAGTGGCCAGAGGAAGACTTCTCGGTGGACTGTGCCAC
 GGTGGAGCTGCCTGATGCTCTTGCCTTCCAAAGTACACTTACTTTTACTCCAATACTATCTCTGA

1.8

 >NALP5/Py8.hs (contiens py12)
 MSDVNPPSDT PIPFSSSSSTH SSHIPPWTF SYPGSPCENG VMLYMRNVSH BELQRFKQLL
 LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVVHLLIE RFPGRRAWDV TSNI PAIMNC DKMCVVVRE
 INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPINDITW PGNQRDFYQ
 GVHRHEEYLP CLLLPKRPQG RQPKTVAIQG APGIGKTLA KKVMEFWARN KFYAHKRWCA
 FYFHCQEVNQ TTDQSFSELI EQKWPQSQDL VSKIMSKPDQ LLLLLLDGFEE LTSTLIDRLE
 DLSEDWRQKL PGSVLLSSLL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLKCP S LVTLPGFNIM
 EKIKYFQMYF GHTTEGDQVL SFAMENTILF SMCRRVPVVCW MCVSGLKQOM ERGNLTLQSC
 PNATSVFVRY ISSLFPTRAE NFSRKIHQAQ LEGLCHLAAD SMWHRKWVLG KEDLEEAKLD
 QTGVTAFLGM SILRRIAGEE DHYVFTLVTF QEFFAALFYV LCFPQRLKNF HVLSHVNIQR
 LIASPRGSKS YLSHMGFLFLF GFINEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP
 SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSAFCLK RCQYLHEVEL
 TVTLNFMNVW KLSSSSSHPGS DLRRVNSTML NQDLIGVLTG NQHLRYLEIQ HVEVESKAVK
 LLCRVLRSPR CRLQCLRLD CLATPRIWTD LGNNLQGNH LKTLILRKNS LENCAYYLS
 VAQLERLSQS KMLTHLSLAE NALKDEGAH IWNALPHLRC PLQRLVLRKC DLTFNCCQDM
 ISALCKNKTL KSLDLFSNLS KDDGVILLCE ALKNPDCTLO ILELENCLEF STCCQAMASM
 LRKNQHLRHL DLSKNAIGVY GILTLCEAFS SQKKEEVIF TIHNSQDLEA PKCPSTDEWI
 KKMWYLRTME YYSAMKKL KRNNGIETA HWCSGPTCSI LPKNPLFPQN LSSQPCIKME
 GDKSLTFSSY GLOWCLYELD KEFQTFKEL LKKSSSEST CSIPQFEN ANVECLALLL
 HEYVGASLAW ATSIISIFEN NLRTLSEKAR DDMKRHSPED PEATMTDQGP SKEKVPGISQ
 AVQQDSATAA ETKEQEISQA MEQEGATAAE TEEQEISQAM EQEGATAAET EQQHGDDTW
 DYKSHVMTKF ABEEDVRRSF ENTAADWPEN QTLAGAFDSD RWGFRPRTVV LHGKSGIGKS
 ALARRIVLCW AQGGLYQGMF SYVFFLPVRE MQRKKESSVT EFISREWPS QAPVTEIMSR
 PERLLFIIDG FDDLGSVLNN DTKLCKDWA E KQPPFTLIRS LLRKVLLPES FLIVTVRDVG
 TEKLESEVVS PRYLLVRGIS GEQRHLLLE RGIGERHQTQ GLRAIMNRE LLDQCVPAV
 GSLICVALQL QDVVGESVAP FNQTLTGLHA AFVHQLTFR GVVRRCINLE ERVVLKRFGR
 MAKEGVWNRK SVFDGDDLMV QGLGESELRA LFHMNILLPD SHCEHYTTF HLSDQDFCAA
 LYYVLEGLEI EPALCPLYVE KTKRSMELKQ AGFHIHSLWM KRFLFLVSE DRRRPLEVLL
 GCPVPLGVKQ KLLHWVSLG QQP NATTPGD TLD AFHCLFE TDQKEFVRLA LNSFQEVWLP
 INQNLDLIAS SFCLQHCPYL RKIRVDVKG I FPRDESABAC PVVPLWMDK TLIEQWEDF
 CSMGLTHPHL RQLDLGSSIL TERAMKTLCA KLRHPTCKIQ TLMFRNAQIT PGVQHLWRIV
 MANRNLRLSN LGGTHLKEED VRMACRALKH PKCLLESRL DCCGLTHACY LKISQILTS
 PSLKSLSLAG NKVTDQGVMP LSDALRVSQC ALQKLILED C GITATGCQSL ASALVSNRSL
 THLCLSNNSL GNEGVLNLCR SMRLPHCSLQ RLMLNQCHLD TAGCGFLALA LMGNLWTHL
 SLSMNFVEDN GVKLLCEVMR EPSCHLQDLE LVKCHLTAA CESLSCVISR SRHLKSLDLT
 DNALGDGGVA ALCEGLKQKN SVLTRLGLKA CGLTSDCCEA LSLALSCNRH LSLNLVQNN
 FSPKGMKLC SAFACPTSNL QIIGNDSEEN DVLRESALVV LKVTVSKNL SMTLRENLLY
 LPKPYNTTRH RDSEEGIHGW TERLWKQYP VQIRKLEEV QLLKPRVVID GSWHSFDEDD
 RLDLQSQNS HSARQTYNLM ASQKSDPINP ATFRDLRSTA DGGTGHFHIG VPPVGCRRVS
 DVPAPTCQVR DEVGILVHNS QKVQTHVSI SR

>NALP5/Py8.dna |GENSCAN_predicted_CDS_1|6939_bp
 atgagtgaacgtgaatccaccctctgacacccccattcccttttcactcctccactcac
 agttctcatattccgccttgacattctcttctaccccggtcccatgtgaaatggg
 gtcattgctgtacatgagaacgtgagccatgaggagctacaacggttcaagcagctctta
 ctgactgagctcagtactggcaccatgccatcacctgggaccaggtcgagacagccagc
 tgggcagaggtggtctctctcttgatagagcgtttccctggacgacgcgcttgggatgtg
 acttcgaacatctttgccattatgaactgtgataaaatgtgtgtgtgtagtccgcagagag
 ataaatgccattctgcctaccttggaaaccagaggactgaatgtgggagaacacaggtg
 aatctggaggaaggagaatctggtaaaatacggcggtataaatcgaatgtgatggaaaag

Forts. Fig. 1

tttttccccatatgggacattacgacttggcctggaaaccagagggacttcttctaccaa
ggtgtacacagggcacgaggagtacttaccatgtctgttctgcccacaaagaccccaggg
agacagcccagaacgctggccatacagggagctcctgggatcggaacaaacatcctggcc
aaaaaggtgatgtttgagtgggcccagaaacaagtctacgccccacaagcgctggtgtgt
ttctacttccattgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt
gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaacccgaccaa
cttctgtgtctcttggatggctttgaggagctcacatctaccctcattgacagactggag
gacctgagtgaagactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagtttgtgt
agcaaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag
acatgcaagcccttgtgaaatgtccctctctcgttaacccttccgggggtttaaatacgtg
gaaaaaatcaagtatttccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg
agtttccgcatggaaaaacaccattctcttctccatgtgcgggtccctgtggtttgtgtg
atggtctgtctgtgtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaaatctcacacagctcatgt
ccaaatgccacctctgtgttgcgtccggtatatttctagcttgtttcccaccagagctgag
aacttttccagaaagatccaccaagcacaaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac
agcatgtggcacaggaatgggtgttaggttaagaagatcttgagggaagccaagctggat
cagacgggagtcacgcgcttccctggcatgagtattcttccggagaattgcagggtgaggaa
gaccactatgtcttaccctcgtgacttttcaggaattttttgcccgttgttttatgtt
ctctgtttccacaaagactcaaaaaatttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc
ctgatagcaggtcccagagggaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttattc
gggttttctgaacgagggcctgcgcttccgcccgtggaacagtcattccaaagcaaggtgtct
tctcggtaataagaggaaactgctgaaagtcatacctctgttgcataaattgtgaccacct
tctccgggcagtggggtccgcaggtatttctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc
tttgaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa
gaagtccaagtgtctgtttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcagtgagggtggaactg
accgtcaccctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct
gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgttgaaccaggacttaatcggtgttttgacgggg
aaccagcatctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtggagtccaaagctgtgaag
cttctatgcagggtgtgagatccccccggtgcccgtctgcaggtgtctcaggttggagac
tgcttggccacccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat
ctaaagactctcactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgattacctgtct
gtggcccagctggagaggctgtgcagagtaagatgtgacccacctgagcttggcagaa
aacgccttgaagatgaaggggccaagcatatttggaaatgccctgccacacctgagatgt
cctctgcagaggctggtactgagaaagtgtgacttgacctttaattgtgtcaggatag
atctctgcgtctgtaaaaataaaacccctgaaaagcttgcacctaaagttttaatagcctg
aaggatgagtgggtgatcctgtctgtgtgaggccctgaagaacctgactgtacattacag
atcctggagctggaaaactgcctgttccctccatctgtgtccagggccatggcttccatg
ctccgcacaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctcat
ggtattctgacctgtgtgcaggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcatttcc
actattcacaatagccaagatttggaaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata
aagaaaatgtggtacttaccgcaaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag
tgtagaacaatggtatcatagaacagcacactggtgtcaggctcctacttgctctata
ttaccaagaatccacttttcccccaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac
aaggaagaatttccagacattcaaggaattactaaagaagaaatcttcagaatcgaccaca
tgctctatttccacagtttgaatcgagaatgccaacgtggaatgtctggcactcctcttg
catgagtattatggagcatcgctggcctgggtacgtccattagcatcttggaaaacatg
aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgcagggaatttcacaa
gctgtgcaacaagatagtgcacagctgcagagacaaaagaacaaagaaatttcacaagct
atggaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaagaaatttcacaagctatg
gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaagacatggagggtgacacatgg
gactacaagagtcacgtgatgaccaaatctcgtgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt
gaaaacactgctgtgactggccggaaatgcaaacgttggctgggtgttttgattcagac
cgggtggggcttccggcctcgacgggtgttctgcacggaaagttaggaattgggaaatcg
gctctagccagaaggatcgtgtgtgtgtgggcgaaggtggactctaccagggaaatgttc
tctactcgtcttcttccctccgttagagagatgcagcgggaagaaggagagcaggtgtcaca
gagttcatctccaggagtggtggccagactcccaggctccgggtgacggagatcatgtcccga

Forts. Fig. 1

ccagaaaggctgttgttcatcattgacgggttccgatgacctgggctctgtcctcaacaat
gacacaaagctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcaccctcatacgcagt
ctgctgaggaaggctcctgctccctgagtccttctgatcgtcaccgtcagagacgtgggc
acagagaagctcaagtcagaggtcggtgtctcccggttacctgttagttagaggaatctcc
ggggaacaaagaatccacttgcctctgagcggggattgggtgagcatcagaagacacaa
gggttgcgtgcatcatgaacaaccgtgagctgctcgaccagtgccaggtgcccgccgtg
ggctctctcatctgcgtggccctgcagctgcaggacgtgggtggggagagcgtcgcccc
ttcaaccaaagcctcacaggcctgcacgcgcgttttgtgttcatcagctcaccctcga
ggcgtggctccggcgtgtctcaatctggaggaaagattgtcctgaagcgttctgcgt
atggctgtggaggagtggtgaataggaagtcagtggttgcagggtgacgacctcatggtt
caaggactcggggagctctgagctccgtgctctgttccacatgaacatccttctcccagac
agccactgtgaggagtactacacctcttccacctcagctctccaggacttctgtgccgcc
ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgccctctgtacgttgag
aagacaaagaggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatctccactcgcttgggatg
aagcgtttcttgttggcctcgtgagcgaagcgttaaggaggccactggaggtcctgctg
ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt
cagcagcctaatagccaccacccaggagacacctggacgccttccactgtctttcgag
actcaagacaaagagtttgttgcgttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgctccagcactgtccgtatttg
cggaaaaatcgggtggatgtcaaaggatcttcccaagagatgagtcgctgaggcatgt
cctgtggtccctctatggatgctgggataagacctcattgaggagcagtgaggagatttc
tgcctcatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg
acagagcggggcctgaagacctgtgtgccaagctgaggcatcccacctgcaagatacag
acctgtatgtttagaaatgcacagattaccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgct
atggccaacctgaacctaaatccctcaacttgggaggcaccacctgaaggaaagaggt
gtaaggatggcgtgtgaagccttaaacacccaaaatgttgttggagtccttggaggctg
gattgtgtggattgacctatgctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc
cccagctgaaatctctgagcctggcaggaaacaaggtgacagaccaggagtgatgct
ctcagtgatgccttgagagctctccagtgccgcttcagaagctgatactggaggactgt
ggcatcacagccacgggttgccagagctctggcctcagccctcgtcagcaaccggagcttg
acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga
tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgatgctgaatcagtgccacctggac
acggctggctgtggtttcttgcacttgcgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgagaggtcatgaga
gaacctcttgtcatctccaggacctggagttggtaagtgatctcaccgcccgtgctg
tgtgagagctctgctctgtgtgactctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg
gacaaatgccctgggtgacgggtgggttgcctgcactgtgcgaggagactgaagcaaaagac
agtggtctgacagagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgatgtgtgaggca
ctctccttggcccttctctgcaaccggcatctgaccagtctaaacctgggtgcagaataac
ttcagtcctcaaggaatgatgaagctgtgttggccttggcctgtcccacgtctaaactta
cagataatggcaatgactctgaagaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtgtt
ttgcttaaagtcactgtttccaagaacctatcaatgacattaaaggagagaacttactgtac
ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaaggaattcatggatgg
actgaaaggctgtggaatggcagtaacctgtgcaataaggaagctgctggagggaagtg
cagctactcaagccccgagtcgtaattgacggtagttggcattcttcttgatgaagatgac
cgattggatcttcaaagccagcaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg
gcatcacagaagtcagatcccatcaacctgccacattccgttggatagaagcactgtg
gacgtggggacccggccacttccacatcggggtcccgcctgtgggtgttaggtgttcagt
gacgtccctgcttttacctgccaggtgaagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc
caaaagggtgcagacaacccacgtgtctatcagcagatga

1.9

>NALP6/PY9

MDQPEAPCSSTGPRLAVARELLLALEELSQEQLKRFHKLKRDVGPDRSIPWGRLEERADAVDLAEQLAQF
YGPEPALEVARKTLKRADARDVAAQLQERRIQLGLGSGTLLSVSEYKKKYREHVLQLHARVKERNARSVK

Forts. Fig. 1

ITKRFTKLLIAPESAAPBEALGPAREPEPRARRSDTHTFNRLFRDEEGRRPLTVVLQGPAGIGKTMMAK
 KILYDWAAGKLYQGQVDFAFFMPCGELLERPGTRSLADLILDQCPRGAPVPMQAQPRLLFLDGADEL
 PALGGPEAAPCTDPFEAASGARVLGGLLSKALLPTALLVTTTRAAAPGRLOGRILCS PQCAEVRGFSKDKK
 KYFYKFFRDERRAERAYRFVKENETLFCVFPVVCWIVCTVLRQQLLELGRDLRSRTSKTTTSVYLLFTTSV
 LSSAPVADGPRLOQDLRLNLCLAREGVLGRRRAQFAEKELEQLELRGSKVQTLFLSKKELPGVLETEVYQF
 IDQSFQEFLLAALS YLLEDGGVPRTAAGGVGTLLRGDAQPHSHLVLTTRFLFGILLSAERMRIERHFGCMVS
 ERVQKEALRWVQGGQCGCPGVAPEVTEGAKGLEDTERPEEEEEEGEENYPLELLYCLYETQEDAFVROALC
 RFPELALQVRVFCRMDVAVLSYCVRCPPAGQALRLISCLVAAQEKKKSLGKRLQASLGGGSLWLTQALP
 EVPPRPPCCDICPTPPDPRLQLQKAFARVPLNIAPIQPLPRGLASVERMNVTVLAGAGPGDPKTHAMTDP
 LCHLSLTLSHCKLPDAVCRDLSEALRAAPALTELGLLHNLSEAGLRMLSEGLAWPQCRVQTVRVQLPDP
 QRGQLYLVGMLRQSPALTTLDLSCQLPAPMVTYLCVAVLQHQCGQLQTLSLSLPSDPTPSSFSGRCREPGR
 RLGLSRWPRSAPEPSGDSEARTQVEAAGGAGGRRRGREPPARGPHQPQPRDAARGPGSSFAHSGRFVQG
 TPGPRTRPTRLPLPAGTEGSRGRGRESTSRPRARPSDRPRRPGTAPASQRPSPGSGRGPRTFLVARQPGSS
 FLPALAWSRGTVPTLAPGDRVGLRPLRPSSMEDAGEDPTTFAHSLPSDPRLLATVTNAYLGRVHDT
 LHVSGVYNGAGDTHRAMLPSPLNVRLEAPAGMGELTETFALDTNTGSFLEHTEGPRFRASQCTYAHRTL
 PHVLAFRVSIARLAPGSGPITLLLSAFSPESPDLDLHQGPDFOGARYLYGHTLTPEQPGGPQOEVMHWT
 PAPPDLTLGEGEEARTWDFLTAVGGSQAQAQACLTALQLQARGALYTAHAQAWAQLWVECCLDVVGPLQL
 RQALRGSLYLLSALPQPKAPGYICHGLSPGGLSNGSREECYWGHVFWDDQDLWMFPSILMFHPEAARALE
 YRIRTLGDALENAQNLGYQAKFAWESADSGLEVCPEDITYGVQEVHVGAVVLAFAFLYYHTTQDLQLFRE
 GGWDVVRVAVAEFWCSRVEWSPREEKYHLRGVMSPEYHSGVNNSVYTNVLVQNSLRFAAALAQDLGLPIPS
 QWLAVADKIKVFPDVEQNFHPEFDGYEPDPRVCPGTPSSQRHLPVGEVVKQADVLLGYVPFSLSPDVR
 KNLEIYEAVTSEPGPAMTWSMFVAGWMELKDAVRARGLLDRSFANMAEPFKVWTENADGSGAVNFLTGMGG
 FLQAVVFGCTGFRVTRAGVTDFPVCLSGISRSVSGIFYQGNKLNFSFSEDSVTVEVTARAGPWAPHLEAE
 LWPQSRLSLPLGHKVSFPRASAGRIQMSPPKLPSSSSSEFPGRTPSDVRDPLQSPPLWVTLGSSSPTESLTV
 DPASE

>NALP6/PY9.dna

ATGACACAGCCAGAGGCCCTGCTCCAGCACGGGGCCGCGCTCGCGGTGGCCCGGAGCTGCTCCTGGC.
 TGCGCTGGAGGAACTGAGCCAAGAGCAGCTGAAGCGCTTCGCCACAAGCTGCGCGACGTGGGCCCGGACG
 GACCCAGCATCCCGTGGGGCGGCTGGAGCGCGCGGACCGCGTGGACCTCGCGGAGCAGCTGGCCCACTTC.
 TACGGCCCCGAGCCTGCGCTGGAGGTGGCCCGCAAGACCCTCAAGAGGGCGGACGCGCGGACGTGGCGGC
 GCAGCTCCAGGAGCGGCGCTGCGAGCGCTCGGGCTCGGCTCGGGGACGCTGCTCTCCGTGTCCGAGTACA
 AGAAGAAGTACCGGGAGCAGTGTGTCAGCTGCACGCTCGGGTGAAGGAGAGGAACGCCCGCTCCGTGAAG
 ATCACCAGCGCTTCACCAAGCTGCTCATCGGCCGAGAGCGCGCCCGGAGGAGGCGCTGGGGCCCGCG
 GGAGAGCCTGAGCGCGGGCGCGCGCGCTCGGACACGACACTTTCACCGCCTCTTCGCGCGGACG
 AGGAGGGCCGCGCGCGCTGACCGTGGTGTGTCAGGGCCCGCGGCGCATCGGCAAGACCATGGCGGCCAAA
 AAGATCCTGTACGACTGGCGCGCGGCAAGCTGTACAGGGCCAGGTGGACTTCGCTCTCTTCATGCCCTG
 CGGCGAGCTGTGAGAGGGCCGGGACGCGCAGCCTGGCTGACCTGATCCTGGACAGTGCCCGGACCGCG
 GCGCGCGGTGCCGAGATGCTGGCCGAGCCGAGCGGCTGCTCTTCATCCTGGACGGCGCGGACGAGCTG
 CGGCGCTGGGGGGCCCGAGGCGCGCGCTGCACAGACCCCTTCGAGGCGGCGAGCGGCGCGGCTGCT
 AGGCGGGCTGTGAGCAAGGCGCTGCTGCCACGCGCCTCTGCTGCTGACACGCGCGCGCGCGCCCG
 GGAGGCTGCAGGGCGCGCTGTGTTCCCGCAGTGCAGCGAGGTGCGCGGCTTCTCCGACAAGGACAAGAAG
 AAGTATTTCTACAAGTTCTTCGGGATGAGAGGAGGGCCGAGCGCGCTACCGCTTCGTGAAGGAGAAGCA
 GACGCTGTTTCGCGCTGTGCTTCGTGCCCTTCGTGTGCTGGATCGTGTGCACCGTGTGCGCCAGCAGCTGG
 AGCTCGGTCCGGACCTGTGCGCACGTCCAAGACCACCACTGAGTGTACCTGCTTTTCATCACCAGCGTT
 CTGAGCTCGGCTCCGCTAGCCGACGGGCCCGGTTGACGGGCGACCTGCGCAATCTGTGCGCGCTGGCCCG
 CGAGGGCGTCTCGGACCGAGGGCGCAGTTTCCGAGAAGGAAGTGGAGCAACTGGAGCTTCGTGGCTCCA
 AAGTGCAGACGCTGTTTCTCAGCAAAAAGGAGCTGCGGGCGTGTGAGACAGAGGTACCTACGAGTTT
 ATCGACAGAGCTTCCAGGAGTTCTCGCGGACTGCTCTACTGCTGGAGGACGGCGGGGTCGCCAGGAC
 CGCGGCTGGCGGCTTGGGACACTCCTGCGTGGGGACGCCAGCGCACAGCCACTTGGTGTCTACCAAGC
 GCTTCCTCTTCGAGCTGTGAGCGCGGAGCGGATGCGGACATCGAGCGCACTTCGGCTGTCATGTTTCA
 GAGCGTGTGAAGCAGGAGGCCCTGCGGTGGTGCAGGGAAGGACAGGGCTGCCCCGGAGTGGCACCA
 GGTGACCGAGGGGGCCAAAGGGCTGAGGACACCGAAGAGCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 ACTACCCACTGGAGTTGCTGTACTGCTGTACGAGACGCGAGGAGGACGCGTTTGTGCGCCAGGCGGTG
 CGGTTCCCGAGCTGCGGCTGCGAGGAGTGCCTTCTGCGCATGGACGTGGCTGTTCTGAGCTACTGCGT
 GAGGTGCTGCCCTGCTGACAGGCACTGCGGCTGATCAGCTGCAGATTGTTGCTGCGCAGGAGAGAAGA
 AGAAGAGCCTGGGGAAGCGGCTCCAGGCCAGCCTGGTGGCGGCGAGCTGGCTGGGGACCCAACTGGCTCCA

Forts. Fig. 1

GAAGTACCTTTTCGACCACCTTGCTGTGACATCTGCCACACCTCCACCAGACCTCGGCTCCTCCAGGG
CAAGGCTTTTGCCAGAGTTCTTTGAATATAGCTCCAATTGAGCCCTGCCAGGGGCTTGGCATCTGTTG
AGAGGATGAATGT CACGGTGT TGGCAGGGGCTGGGCTGGGGACCCAAAGACCCATGCAATGACTGACCCA
CTGTGCCATCTGAGCAGCTCAAGCTGTCCACTGCAAACTCCCTGACGCGGTCTGCGAGACCTTTCTGA
GGCCCTGAGGGCAGCCCCGCACTGACGGAGCTGGGCTCCTCCACAACAGGCTCAGTGAGGCAGGACTGC
GTATGCTGAGTGAGGGCTTAGCCTGGCCGAGTGAGGGTGAGACGGTCAAGGTACAGCTGCCTGACCCC
CAGCGAGGGCTCCAGTACCTGGTGGGTATGCTTCGGCAGAGCCCTGCCCTGACCACCTGGATCTCAGCGG
CTGCCAACTGCCCCGCCCATGGTGACCTACCTGTGTGAGTCTTGACAGCACAGGGATGCGGCCTGCAGA
CCCTCAGCCTCTCGCTTCTTCTGACCCGACCCGAGTTCTTCTCCGACCGTGTGAGAACCCGGGCGC
CGGCTGGGCTGGAGTCTCGCTGGCTCCGAGCGCCCCGAGCCCTCGGGCGACAGCGAGGCGAGGACCCA
GTGGAGGCGGCCGGGGCGCGGGCGAGGAGCGCGGAGGGAACCCCGCCGGCCCGGGCCACCC
CACAGCCGCCCGGGACGCGAGCTCGGGTCCAGGCTCGAGCTTTGCTCACTCAGGGCGCTTCGTGCAGGGA
ACGCCAGGCCCCCGACGCGACCCACGCGGCCGCTGCCAGCGGGGACCGAGGGGAGCCGGGGCCGCGGCCG
CGAGTCCAGCTCCCGCCCCCGGGCCCGGCCAGCGACCGCCCCCGCCCGCCAGGGAACCGCCCCGCTCCC
AGCGACCGCCCCGGGCCCTCGGGGCGGGGACCGCGACCTTCTGGTGGCGCGGAGCGCGGGCGGCTCCTCC
TTCTCTCCCGCCCTGGCGTGGAGCAGAGGGAACAGGTTCCACGCTGGCGCCCGGCGAGCCGGGTGGGGCT
TGGCCGCTCAGGCCAGGCCAGCTCCATGGAGGACCGCCGGCGAGGACCCACCACTGCTTGGCCACTCTC
TGCCCACTGACCCCGCTCTCTTGGCCACTGTGACCAACGCATACCTGGGCACACGAGTGTTCACGACACG
CTGCACGTGAGCGGCGTGTACAATGGGGCTGGCGGGGACACGCAACCGGGCCATGCTGCCAGCCCCCTCAA
CGTCCGGCTGGAGGCCCTTGACGGGATGGGGGAGCAGCTGACCGAGACCTTCGCCCTGGACACCAACACAG
GCTCTTTCTTCA CACCCTGGAGGGCCCGGCTTCGGGCCCTCCAGTGCATCTATGCGCATCGCACGCTG
CCCCACGCTCTGGCTTTTCGAGTGTCCATGCCCCGCTGGGCCCGGGGAGCGGGCCATCAGCTGCTCCT
GGGCTCAGCCTTCTCCCCAGAAAGCCCAGACCTGGACCTGCATCAGGGTCCCTGACTTCCAGGGAGCCCGGT
ACCTGTATGGCCA CACCCTCA CCCCCTGAGCAGCCCGGGGGGCCACAGCAAGAGGTA CACATGCTGTGGACA
CCAGCACCCCCAGACCTGACCCCTTGGGGAAGGTGAGGAGGCTAGGACGTGGGACTTCTGACAGCAGTGGG
CGGACGCCAGGCTGAGGCTCAGGCCCTGCTCACTGAGGCCCTGCAGCTGCAGGCCCGGGAGGCTCTGTATA
CGGCTCACGCA CAGGCCCTGGGCCAGCTCTGGGTAGAATGTGGCTTGGACGTGGTGGGGCCCTGCAGCTG
CGCCAGGCCCTGCGTGGCTCCCTCTACTACCTGCTCAGTGCCTGCCCCAGCCCAAGGCCCCAGGATACAT
CTGCCATGCCCTCAGTCTTGGGGGCCCTTCCAATGGGAGCGCTGAGGAATGCTACTGGGGCCACGTCTTCT
GGGACCAGGACCTCTGGATGTTCCCGAGTATCCTGATGTTCCACCCAGAAGCGCCAGGGCCATCCTGGAG
TACCGCATCCGCA CCGCTGACCGGGGCCCTGGAGAACGCCCCAGAACCTGGGCTACCAAGGAGCCAAAGTTTGC
CTGGGAGAGTGACAGCTCCGGCCTAGAGGTTTGGCCCTGAGGACATTTACGGAGTCCAGGAGGTCCACGTCA
ACGGGGCCCGTGGTGTGGCCCTTCGAGCTGTACTACCATAACCCAGGACCTGCAGCTATTTGAGAGGCT
GGTGGCTGGGACGTGGTCAGGGCTGTGGCCGAGTTTGGTGAGTCTGTGTGAGTGGAGCCCCAGGGAGGA
AAAGTACCACCTGAGGGGAGTCATGTCCCCGACGAGTACCATTCAGGGGTCAACAACCTGTGTACACCA
ACGTCCTCGTCCAGAACAGCCTGCGCTTTGCTGCTGCCCTGGGCCAGGACCTGGGTCTTCCCATCCCCAGC
CAGTGGCTGGCGGTGGCTGACAAGATCAAGGTACCCTTTGACGTGGAGCAGAACTTCCACCCGAGTTCGA
TGGGTATGAGCCTGACCCCTGAGTCTGTCTGGAAACACCTTCCAGTCAAGCGCACCTCCCTGTAGGAGAGG
TGGTGAAGCAGGCAGACGTGCTGCTCTGGGATACCCAGTCCCTTCTCCCTGAGTCTGTATGTTGCGAGG
AAAAATCTGGAGATTTACGAGGCTGTGACGTCCCCCAGGGCCCCGCGCATGACCTGGAGCATGTTTGTGT
GGGCTGGATGGAGCTGAAGGACGCA GTGCGGGGCCGGGGCCCTCTGGA CAGGAGCTTTGGCAACATGGCTG
AACCCTTCAAGGTGTGGACGGAGAATGCAGACGGGTGAGGCGCTGTGAACCTTCTGACAGGCATGGGGGC
TTCTGTCAGGCGGTGGTCTTTCGGGTGCACGGGGTTCAGGGTCAACCCGAGCGGTGTGACCTTTGACCCCTGT
GTGTCTGTGGGGATCTCCAGAGTGAGGCTCTCGGCATCTTCTACAGGGGAACAAGCTCAACTTCTCTT
TTTCCGAGGACTCCGTGACCGTGGAGGTCAAGCTCGAGCAGGGCCCTGGGCTCCTCACCTGGAGGCTGAG
CTGTGGCCATCCAGTCCCGGCTCTCCCTGTTGCCAGGACACAAGGTCTCCTTTCCCGCTCGGCTGGCCG
GATACAAATGTACCCCCGAAGCTGCCCTGGAAGTTCCAGCTCCGAGTTCCTGGGAGGACTTTTTTCAGATG
TTAGGGACCCGCTCCAGAGCCCCCTCTGGGTACCCCTGGGTTCCTCCAGCCCCACCGAGTCACTCACTGTG
GACCCCTGCTCTGAATAA

1.10 >PY10
MASSABLDNFNLQALLEQLSQDELKFKSLIRTIISLGKELQTVPTQTEVDKANGKQLVEIFTSHSCSYWAGMA
AIQVFEKMNRTHLSGRADEHCVMPPP

>PY10.dna

Forts. Fig. 1

ATGGCATCTTCTGCAGAGCTGGACTTCAACCTGCAGGCTCTTCTGGAGCAGCTCAGCCAGGATGAGTTGAG
 CAAGTTCAAGTCTCTGATCAGAACAATCTCCCTGGGAAAGGAGCTACAGACCGTCCCCAGACAGAGGTAG
 ACAAGGCTAATGGGAAGCAACTGGTAGAAATCTTCACCAGCCACTCTGCAGCTACTGGGCAGGGATGGCA
 GCCATCCAGGCTTTTGAAGAATGAATCGAACGCATCTGTCTGGGAGAGCTGATGAACACTGTGTGATGCC
 CCCACCTTAA

1.11

>NALP7/Py11

FFSLNLRSH TSTMTSPQLE WTLQTLLEQL NEDELKSFKS LLWAFPLEDV LQKTPWSEVE
 EADGKKLAEI LVNTSSENWI RNATVNILEE MNLTELCKMA KAEMMEDGQV QEIDNPGLGD
 AEEDSELAKP GEKEGWRNSM EKQSLVWKNF FWQGDIDNFH DDVTLRNQRF IPFLNPRTPR
 KLTFYTVVLH GPAGVGKTTL AKKCMLDWTD CNLSPTLRYA FYLSCKELSR MGPCSFAELI
 SKDWPQLQDD IPSILAQAQR ILFVVDGLDE LKVPFGALIQ DICGDWEKKK PVPVLLGSLI
 KRKMLPRAAL LVTRPRALR DLQLLAQPI YIRVEGFLEE DRRAYFLRHF GDEDQAMRAF
 ELMRSNAALF QLGSAPAVCW IVCTTLKLQM EKGEDPVPTC LTRTGLFLRF LCSRFPQGAQ
 LRGAALRTLSL LAAQGLWAQM SVFHREDLER LGVQESDLRL FLDGDILRQD RVSKGCYSFI
 HLSFQQFLTA LFYALEKEEE EDRDGHAWDI GDVQKLLSGE ERLKNPDLIQ VGHFLFGLAN
 EKRAKELEAT FRCRMSPIK QELLQCKAHL HANKPLSVTD LKEVLGCLYE SQEELAKV
 VAPFKEISIH LNTTSEVMHC SFSLKHCQDL QKLSLQVAKG VFLENYMDFE LDIEFESSNS
 NLKFLBVKQS FLSDSSVRIL CDHVTRSTCH LQKVEIKNVT PDTAYRDFCL AFIGKKTILTH
 LTLAGHIEWE RTMMLMLCDL LRNHKCNLQY LRLGGHCATP EQWAEFFYVL KANQSLKHLR
 LSNVILLDEG AMLLYKTMTR PKHFLQMLSL ENCRLEAS C KDLAAVLVVS KKLTHLCLAK
 NPIGDTGVKF LCEGLSYPCD KLQTLVLQOC SITKLGCYRL SEALQACSL TNLDLISINQI
 ARGWILCQA LENPNCNLKH LRLWSCSLMP FYCQHLGSAL LSNQKLETLG LGQNHLWKSQ
 IIKLPGVLRQ RTGSLKILRL KTYETNLEIK KLEEVKEKN PKLTIDCNAS GATAPPCCDF
 FC

>NALP7/Py11.cdna

ttcttcagccttaacctaaggtctcactactcggagcactatgacatcgccccagctagag
 tggactctgcagacccttctggagcagctgaaacgaggtgaattaaagagtttcaaatcc
 cttttatgggcttttccctcgaagacgtgctacagaagaccccatggtctgaggtggaa
 gaggtctgatggcaagaaactggcagaaattctggtcaacacctcctcagaaaattggata
 aggaatgcgactgtgaacatcttgggaagagatgaattctcacggaattgtgtaagatggca
 aaggctgagatgatggaggacggacaggtgcaagaaatagataatcctgagctgggagat
 gcagaagaagactcggagttagcaaaagccaggtgaaaaggaaggatggagaaattcaatg
 gagaacaatcttgggtctggaagaacaccttttggcaaggagacattgacaatttccat
 gacgacgtcactctgagaaaccaacgggttcattccattcttgaatcccagaacaccacgg
 aagctaacacaccttacacgggtggtgctgcacggccccgcaggcgtggggaaaaccacgtg
 gccaaaaagtgtatgctggactggacagactgcaacctcagccgacgtcagatacgcg
 ttctacctcagctgcaaggagctcagccgcatggggccctgcagtttgcagagctgatc
 tccaaagactggcctgaattgcaggatgacattccaagcatcctagcccaagcacagaga
 atctctgttcgtggtcgatggccttgatgagctgaaagtcacacctggggcgctgatccag
 gacatctgcggggactgggagaagaagaagccggtgcccgtcctcctggggagtgtgctg
 aagaggaagatgttaccagggcagccttgctggtcaccacgcggcccaggggcactgagg
 gacctccagctcctggcgagcagccgatctacataaggggtggagggttcttgaggag
 gacaggagggtctatttctgagacacttgggagcaggagccaagccatgcgtgccttt
 gagctaagtaggagcaacgcggccctgttccagctgggctcggccccgcgggtgtgctgg
 attgtgtgcacgactctgaagctgcagatggagaagggggaggaccgggtcccacactgc
 ctacccgcacggggctgttctcgttctcctcgtcagccgggttcccgcaggggcgacag
 ctgcggggcgcgctgcggacgctgagcctcctggcgcgaggggcctgtgggagcagatg
 tccgtgttccaccgagaggacctggaaaggctcgggggtgcaggagtccgacctccgtctg
 ttcttgagcggagacatcctccgccaggacagagtctccaaaggctgctactcctcctc
 cactcagcttccagcagtttctcactgccctgttctacgccctggagaaggaggaggag
 gaggacagggacggccacgcctgggacattggggacgtacagaagctgcttccggagaa
 gaagactcaagaaccccgactgattcaagtaggacacttcttatccggcctcgctaac
 gagaagagagccaaggagtggaggccactttggctgcggatgtcaccggacatcaaa
 caggaaattgctgcaatgcaaagcacatcttcatgcaataagcccttatccgtgaccgac
 ctgaaggaggtcttgggctgctgtatgagtctcaggaggaggagctggcgagggtggtg
 gtggccccgttcaaggaaatttctattcacctgacaaatacttctgaagtgatgcatgtg
 tccctcagcctgaagcattgtcaagacttgcaaaactctcactgcaggttagcaaaagg
 gtgttccctggagaattacatggattttgaactggacattgaatttgaagctcaaacagc

Forts. Fig. 1

aacctcaagtttctggaagtgaacaaagcttctctgagtgactcttctgtgaggattctt
 tgtgaccacgtaacccgtagcacctgtcatctgcagaaagtggagattaaaaacgtcacc
 cctgacacccgctaccgggacttctgtcttctgcttctcattgggaagaagacctcacgcac
 ctgacctggcagggcacatcgagtgggaacgcacgatgatgctgatgctgtgacctg
 ctgagaaatcataaatgcaacctgcagtagctgaggttgggaggtcactgtgccaccccg
 gagcagtgggctgaattcttctatgtctcctcaaagccaaccagtcctgaagcactgctg
 ctctcagccaatgtgctcctggatgaggggtgcatgttctgtgtacaagaccatgacacgc
 ccaaaacacttctctgcagatgtgtgcttggaaaactgtcgtcttacagaagccagttgc
 aaggaccttgctgctgtcttgggtgtcagcaagaagctgacacacctgtgcttggccaag
 aacccattggggatacaggggtgaagtttctgtgtgagggcttgagtaccctgattgt
 aaactgcagaccttgggtgttacagcaatgcagcataaccaagcttggctgtagatatctc
 tcagagggcgtccaagaagcctgcagcctcacaacacctggacttgagtatcaaccagata
 gctcgtggattgtggattctctgtcaggcattagagaatccaaactgtaacctaaaacac
 ctacgcctctggagctgctccctcatgcttcttattgtcagcatcttggatctgctctc
 ctacgaatcagaagcttgaacctctggacctgggcccagaatcatttgtggaagagtggc
 ataattaaagctcttgggggttctaagacaaagaactggatccttgaagatactcaggttg
 aagacctatgaaactaatttggaaatcaagaagctgttggagggaagtgaagaaaaagaat
 cccaagctgactattgattgcaatgcttccggggcaacggcacctccgtgctgtgacttt
 ttttctga

1.12 >NALP8/Py12

MSDVNPPSDT PIPFSSSTH SSHILPWTF CYPGSPCENG VMLYMRNVSH BELQRFKQLL
 LTELSTGTMP ITWDQVETAS WAEVHLLIE RFPGRRAWDV TSNIFAIMNC DKMCLVLRRE
 INAILPTLEP EDLNVGETQV NLEEGESGKI RRYKSNVMEK FFPIWDITTW PGNQORDFFYQ
 GVRHEEYLP CLLLPKRPOG RQPKTVAIQG APGIGKTILA KKVMFEWARN KFYAHRWCA
 FYFHCQEVNQ TTDQSFSSELI EQKWPGSQDL VSKIMSKPDQ LLLLLLDGFEE LTSTLIDRLE
 DLSEDWRQKL PGSVLLSSLL SKTMLPEATL LIMIRFTSWQ TCKPLLKCPs LVTLPGFNTM
 EKIKYFQMYF GHTEEGDQVL SFAMENTILE SMCRVFVVCW MCVSGLKQOM ERGNLITQSC
 PNATSVFVRY ISSLFPTRAE NFSRKIHQAQ LEGLCHLAAD SMWHRKWVLG KEDLEEAKLD
 QTGVTAFLGM SILRRIAGEE DHYVFTLVTF QEFFAALFYV LCFFPQRLKNF HVLSHVNIQR
 LIASPRGSKS YLSHMLFLF GFLNEACASA VEQSFQCKVS FGNKRKLLKV IPLLHKCDPP
 SPGSGVPQLF YCLHEIREEA FVSQALNDYH KVVLRIGNNK EVQVSAFCLK RCQYLHEVEL
 TVTLNFMNVW KLSSSSHPS E

>NALP8/Py12---Py8.dna

gaaaaaatcaagatttccagatgtatttggacacacagaggaggagaccaagtcttg
 agtttgcgccatggaaaacaccattctcttctccatgtgcgggtccctgtggttctgctgg
 atgggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcagtg
 ccaaatgccacctctgtgttcgtccggtatatttctagcttgttcccaccagagctgag
 aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac
 agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaaagccaagctggat
 cagacgggagtcacgccttccctggcatgagtattcttcggagaattgcaggtgaggaa
 gacctatgtctttaccctcgtgacttttcaggaatttttgcggccttgtttatgtt
 ctctgtttcccacaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccagctgaatatccagcgc
 ctgatagcgagtcccagagggaagcaaaagctatctctctcacatgggactttcttattc
 ggtttctgaacgaggcctgcgcttcggccgtggaacagtcattccaatgcaaggtgtct
 ttcggtaataagaggaaactgctgaaagtacacctctgttgcataaatgtgacccacct
 tctccgggcagtggggtcccgaggttattctactgtctgcatgaaatccgggaggaagcc
 tttgtgaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa
 gaagtcaagtgctctgcttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcagaggtggaactg
 accgtcacctgaacttcatgaacgtgtggaagctcagctccagctcccacctcgtgctct
 gacctaaaggcgtgtgaatagccatgttgaaccaggacttaacgggtgtttgacgggg
 aaccagactctgagatacttggaaatacaacatgtggaagtgagtgccaaagctgtgaag
 ctctatgcaggggtgctgagatcccccggtgcgctctgcagtgctcaggttgaagac
 tgcttggccaccctagaatttggactgatcttggcaataatcttcaaggtaacgggcat
 ctaagactctcactaagaaaaaactccctggagaactgtggggcgtattacctgtct
 gtggccagctggagaggctgtcgagagtaagatgctgacccacctgagcttggcagaa

Forks. Fig. 1

aacgccttgaagatgaagggccaagcatatttgaatgcctgccacacctgagatgt
cctctgcagaggctgggtactgagaaagtgtgacttgacctttaattgctgtcaggatattg
atctctgcgctctgtaaaaataaaacctgaaaagtcttgacctaaagttttaatagcctg
aaggatgatgggtgatcctgctgtgtgagggcctgaagaacctgactgtacattacag
atcctggagctggaaaactgcctgttcacctccatctgctgccaggccatggcttccatg
ctccgcaaaaaccaacatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagctcat
gggtattctgaccttgtgagaggccttctcaagccaaaagaagagagaagagggtcatttcc
actattcacaatagccaagatttgaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata
aagaaaatgtggacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaaagaaacttaag
tgtagaaacaatgggtatcatagaaacagcacactgggtgctcaggctcctacttgctctata
ttaccaagaatccacttttccccaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa
ggagacaaatcgctcaccttttccagctacgggctgcaatgggtgctctatgagctagac
aaggagaatctcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca
tgctctattccacagtttgaatcgagaatgccacgtggaatgtctggcactcctcttg
catgagtatttgagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg
aacctgcgaacctctcggagaaggcacgggatgacatgaaaagacattcaccagaagat
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtggcagggaatttcacaa
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaatcttcacaagct
atggaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaatcttcacaagctatg
gaacaagaagggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgctgaggaggaggatgtacgtcgtagtttt
gaaaacactgctgctgactggcgggaatgcaaacgttggctgggtgcttttgattcagac
cgggtggggcttccggcctcgcaagggtgggtctgcacggaaagtcaaggaatgggaaatcg
gctctagccagaaggatcgctgctgtgctgggctgcaagggtggactctaccagggaatgttc
tcctacgtcttcttccctcccggttagagagatgcagcgggaaggagagcagtgctcaca
gagttcatctccaggagtggtggcagactccagggtccgggtgacggagatcatgtcccgga
ccagaagggtgtgttcatcattgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat
gacacaaggctctgcaaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatacgcagt
ctgctgaggaaggctcctgctccctgagtccttccctgatcgtcacctgcagagacgtgggc
acagagaagctcaagtcaaggtcggtgtctcccggttacctgttagttagagggaatctcc
ggggaacaaagaaatccacttgctccttgagcgcggtgattggtgagcatcagaagacacaa
gggttgctgctgcatcatgaacaacctgagctgctcgaccagtgccagggtgcccgcgctg
ggctctctcatctgctggccttgacgtgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc
ttcaaccaaaccgctcacaggcctgcacggcgttttggtgttcatcagctcaccctcoga
ggcgtggtccggcgctgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgctctgcccgt
atggctgtggaggagtggtggaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatggtt
caaggactcggggagtgctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatcctctcccagac
agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagtcctcaggacttctgtgccgcc
ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgcccctctgtacgttgag
aagacaagagggtccatggagcttaaacaggcaggttccatatccactcgctttggatg
aagcgtttcttgtttggcctcgtagcgaagacgttaaggaggccactggaggtcctgctg
ggctgtcccggtccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt
cagcagcctaattgccaccacccaggagacacctggagcgccttccactgtcttttcgag
actcaagacaaagagtttgttcgcttggcattaaacagcttccaagaagtggtggcttccg
attaaccagaacctggacttgatagcatcttcttctgectccagcactgtccgtatttg
cggaaaatccgggtggatgtcaaaggatcttcccaagagatgagtcggctgaggtatgt
cctgtgggtccctctatggatgcgggataagacctcattgaggagcagtggggaagatttc
tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg
acagagcggggccatgaagacctgtgtgccaagctgaggaccccacctgcaagatacag
acctgatgtttagaatgcacagattacccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgct
atggccaacgcgttaacctaaagatccctcaacttgggaggcaccacacctgaagggaaggat
gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagttcttgaggctg
gattgtctgtggattgacctgacctgttacctgaagatctcccaaatccttacgacctcc
cccagctgaaatctctgagcctggcaggaaacaagggtgacagaccagggagtaatgcct
ctcagtgatgccttgagagctctccagtgccctgcagaagctgatactggaggactgt
ggcactcacagccaggggtgcccagagctgtggcctcagccctcgtagcaaccggagcttg
acacacctgtgcctatccaacaacagcctggggaacgaagggtgtaaatctactgtgtcga
tccatgaggcttccccactgtagtctgcagaggctgatgctgaatcagtgccacctggac

Forks. Fig. 1

```

acggctggctgtgggttttcttgcaacttgccgttatgggtaactcatggctgacgcacctg
agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgaggtcatgaga
gaaccatcttgtcatctccaggacctggagttggtaaagtgtcatctcaccgccgcgtgc
tgtgagagtctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg
gacaatgccctgggtgacgggtgggttgctgcaactgtgagggactgaagcaaaagaac
agtgttctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgat tgcgtgaggca
ctctccttggccctttcctgcaaccggcatctgaccagtctaaacctggcgagaataac
ttcagtcccaaagggaatgatgaagctgtgttcggcctttgctgtcccacgtctaactta
cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtagtt
ttgcttaaagtcaactgtttccagaacctatcaatgacattaagggagaaacttactgtac
ctcccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg
actgaaaggctgtggaatggcagtagacctgtgcaataaggagctgctggaggaaagtgc
cagctactcaagcccgagtcgtaattgacggtagttggcattctttgatgaagtac
cgattggatcttcaaagccagcaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg
gcatcacagaagtcatatcccatcaacctgccacattccgtttggatagaagcactgct
gacgggtgggacccgaccttccacatcggggctcccgctgtgggctgtagggtgttcagt
gacgtccctgcttttacctgccaggtaagagatgaagtaggtatccttgttcacaacagc
caaaaggtgcagacaaccacgtgtctatcagcagatga

```

1.13 >NALP9/Py13

```

MAESFFSDFG LLWYLKELRK EEFWKFKELL KQPLEKFELK PIPWAEKKA SKEDVAKLLD
KHYPGKQAWV VTLNLFQIN RKDLWTKAQE EMRSILASL FGGSSRGAQL LFCPRWKDLP
LWAKVVIVFD PGETFRIDAY GAVREEVDTH PAGHISRISP GATNGVIDIT ARLSSRPFSI
LSA

```

>NALP9/Py13.cdna

```

atggcagaatcttttttttcggattttggcttgttgggtatctgaaggagctcagaaag
gaagagtttttgaaatttaaggagctcctcaacaacctttggagaaattgaactcaag
ccaatccctgggtgagctgaagaaggcctccaaagaagatgtagcaagctgctggac
aaacattaccagaaagcaggcatgggaggttaacactgaacctgttctacagatcaat
aggaaagatctctggacaaaggctcaggaagagatgagaagaagcattcttgcgagcttg
tttggaggttctagtaggggagcacagcttctcttctgcccgcgatggaaggaccttct
ctatgggcaaaggttgtcatcgtctttgaccaggaggagactttcaggacggagcagcat
ggagcagtgaggagggaagtggacacccaccagctggccacatcagccgaattagccct
ggggcgaccaatggggtgacagacatcacagccaggtgtcctcacgtcctggaagcatt
ctttctgcataa

```

1.14

>NALP10/Py14

```

MAMAKARKPR EALLWALSOL EENDFKKLKF YLRDMTLSEG QPPLARGELE GLIFVDLAEL
LISKYGEKEA VKVVLKGLKV MNLLELVDQL SHICLHGVMW HWKDNSRQKK VLDWATGTLY
PGRFDYVFYV SCKEVVILLE SKLEQLLFWC CGDNQAPVTE ILRQPERLLF ILDGFDLQR
PFEKLLKRG LSPKESLLHL LIRRHTLPTC SLITTRPLA LRNLEPLLKQ ARHVHILGFS
EERARYFSS YFTDEKQADR AFDIVQKNDI LYKACQVPGI CWVVCSSLQG QMERGKVLE
TPRNSTIDFM AYVSTFLPPD DDGGCSELSR HRVLRSLCSL AAEQIQHQR LFEAEELRKH
NLGPRLLAF LSSNDYQLGL AIKKFYSFRH ISFQDFHAM SYLVKEDQSR LGKESRREVQ
RLLEVKEQEG NDEMTLTMQF LLDISKKDSF SNLELKFCFR ISPCLAQDLK HFKEQMESMK
HNRTWDLBFS LYEAKIKNLV KVFR

```

>NALP10/Py14

```

atggccatggccaaggccagaaaagcccgaggaggttgcctctgggccttgagtgacctt
gaggagaacgatttcaagaagttaaagttctacttacgggatatgacctgtctgagggc
cagccccactggccagaggggagttggagggcctgattccggtggacctggcagaatta
ctgatttcaaagtatggagaaaaggaggctgtgaaagttgtcctcaagggttgaagggtc
atgaacctgttggaacttgtggaccagctcagccatatttgcctgcaggggtcggctgg
cactggaagacaactctcgccagaaaagggtgttgactgggccaacgggtactctgtac
ccaggccggtttgattatgtctttatgtaagctgcaagaagtggtcctgctgctggag
agcaaacggagcagctcctttctggtgctgcggggacaatcaagccctgtcacagag
attctcaqcaqccacacacqccctcctgttcatcctggatggctttgatgagctgcagagg

```

Forts. Fig. 1

```

ccctttgaagaaaagttgaagaagaggggtttgagtcaccaaggagagcctgtgcacctt
ctaattaggagacatacactcccacgtgtccttctcatcaccaccggccctggct
ttgaggaatctggagcccttgtgaaacaagcacgtcatgtccatatcctaggcttctct
gaggaggagagggcgaggtaacttcagctcctatttcacggatgagaagcaagctgacggt
gccttcgacattgtacagaaaaatgacattctctacaaagcgtgtcaggttccaggcatt
tgctgggtggctgtcctcctggctgcaggggcagatggagagaggcaagttgtcttagag
acacctagaacagcactgacatcttcatggcttacgtctccaccttctgcccgcgat
gatgatgggggtgtcctcgagcttcccgccacagggctcctgaggagtctgtgtcccta
gcagctgaagggtattcagcaccagagggtcctatttgaagaagctgagctcaggaaacat
aatttagatggccccaggttgcgcttctctgagtagtaacgactaccaattgggactt
gccatcaagaagttctacagcttccgccacatcagcttccaggactttttctatgccatg
tcttacctgggtgaaagaggaccaaaagccggctggggaaggagtcccgagagaagtgcga
aggctgtgtggggtaaaggagcaggaagggaatgatgagatgacctcactatgcagttt
ttactggacatctcgaaaaagacagcttctcgaaacttggagctcaagttctgtctcaga
atttctcctgttttagcgaggatctgaagcattttaagaacagatggaatctatgaag
cacaacaggacctgggatttgggaattctcctgtatgaagctaaaaataagaatctggtg
aaagtattcagatga

```

1.15 >NALP11/Py15

```

MARSDSTDFD LLWYLENLSD KEFQSFKKYL ARKILDFKLP QFPLIQMTKE ELANVLPISY
EGQYIWNMLF SIFSMRKED LCRKIIGRRN HVFYILQLAY DSTSYYSANN LNVFLMGERA
SGKTIVINLA VLRWIKGEMW QNMISYVVHL TSHEINQMTN SSLAELIAKD WPDGQAPIAD
ILSDPKKLLF ILEDLDNIRF ELNVNESALC SNSTQKVPIP VLLVSLKRR MAPGCWFLIS
SRPTRGNVVK TFLKEVDCT TLQLSNGKRE IYFNSFFKDR QRASAALQLV HEDEILVGLC
RVAILCWITC TVLKRQMDKG RDFQLCCQTP TDLHAFLAD ALTSEAGLTA NOYHLGLLKR
LCLLAAGGLF LSTLNFGED LRCVGFTAD VSVLQAANIL LPSNTHKDRY KFIHLNVQEF
CTAIAFLMAV PNYLIPSGSR EYKEKREQYS DFNQVFTFIF GLLNANRRKI LETSFGYQLP
MVDSEFKWYSV GYMKHLDRDP EKLTHMPLF YCLYENREER FVKTIVDALM EVTVYLQSDK
DMMVSLYCLD YCCHLRTLKL SVQRIFQNK EPLIRPTARLS YVSTASGFED LLKALARNRS
LTYLSINCTS ISLNMFSILH DILHEPTCQI SHLX

```

>NALP11/Py15.cdna

```

atggcagaatcggattctactgactttgacctgtgtggtatctagagaatctcagtgac
aaggaatttcagagttttaagaagtatctggcagcgaagattcttgatttcaaactgcc
cagtttccactgatacagatgacaaaagaagaactggctaactgttgccaatctcttat
gaggacagtatatatggaatatgtctcttcagcatatttcaatgatgcgtaaggaagat
ctttgtaggaagatcattggcagacgaaacctgtgttctacatacttcaattagcctat
gattctaccagctattattcagcaacaatctcaatgtgttctctgatgggagagagagca
tctggaaaaactattgttataaatctggctgtgttgagggtggatcaagggtgagatgtgg
cagaacatgatctcgtacgtcgttcacctcacttctcacgaaataaaccagatgaccaac
agcagcttggtgagctaactcgccaaggactggcctgacggccaggctcccatgacagac
atcctgtctgatcccaagaactccttttcatcctcgaggacttggacaacataagattc
gagttaaatgtcaatgaaagtgtttgtgtagtaacagcaccagaaagtcccattcca
gttctcctgggtcagttgtctgaagagaaaaatggctccaggctgtgttctcatctcc
tcaaggccacacgtgggaataatgtaaaaacgttcttgaaagaggttagattgtgtcacg
acctgacagctgtcgaatgggaagaggagatatattttaactcttctttaagaccgc
cagagggcgctcggcagccctccagcttgatcatgaggatgaaatactcgtgggtctgtgc
cgagtgcctatctatgtggatcacgtgtactgtcctgagcggcagatggacaagggg
cgtgacttccagctctgtgtgccaacacccactgatctacatgccactttctgtgtgat
gcgttgacatcagaggctggacttactgccaatcagtatcacctagggtctcctaaaacgt
ctgtgtttgtgtggctgcaggaggactgttctgagcaccctgaatttcagtgggtgaagac
ctcagatgtgttgggtttactgaggtgatgtctctgtgttgaggccgcgaatattctt
ttgccgagcaacactcataaagaccgttacaagttcatacacttgaacgtccaggagttt
tgtacagccattgcatttctgatggcagtagccaactatctgatccctcaggcagcaga
gagtataaagagaagagagaacaatactctgactttaatcaagtgttactttcattttt
ggctctctaaatgcaaacaggagaaagattcttgagacatcctttggataccagctaccg
atggttagacagcttcaagtgggtactcgggtgggatacatgaaacatttggaccgtgaccg
gaaaagttgacgcaccatagcctttgttttactgtctctatgagaatcggaagaagaa

```

Forts. Fig. 1

tttgtgaagacgattgtggatgctctcatggagggttacagtttaccttcaatcagacaag
 gatatgatgggtctcattatactgtctggattactgtgtcacctgaggacacttaagttg
 agtgttcagcgcatctttcaaaacaagagccacttataaggccaactgctaggttgctc
 tatgtctcgactgcttcttggttttgaagacttactcaaggccttggtcgtaatcgagc
 ctgacatacctgagtatcaactgtacgtccatttccctaaatatgttttacttctgcat
 gacatctgcacgagcccatgccaataagtcattctgagn

1.16

>Py16 (mouse)

MASFFSDFGMLMYLEELNKEFMKFKEFLKQELQLRLKQISWTEVKKASREDLANLLK
 HYEEKKAWDMTFKI FQKMNKDLMERAGREIAGLSNTGPPDRYEAPNTHTVEDFQVCVHS
 EMMHLTLKRLQAPGNLEARI PMVIEATVVFKTGEPDAIALEVELQMGFDLSCILPNVSA
 YRVLDIVLPEDPAI PLLGIYPEDVPTVRPGYPTABEQSDLSKSHLMKTI IEDFKIINNS
 LKEIQENSGKQV

>Py16.dna

atggcctctcttttttctgattttggccttatgtggacttagaagagctaacaagaaa
 gaattcatgaagtttaaggaattccctcaaacaggagattttgcagttgagactgaaacag
 atttcttgaccgaagtgaagaaggcatctcgtgaagaccttgccaacttactgttgaaa
 cattatgaggagaagaagccttggtatgatgaccttcaaaatctccagaagatgaatagg
 aaggatctcatggagagggcaggaagagagattgtgtgctctcaaacactggaccacca
 gacagatatgaggccccaacacacatacagtagaggacttccagggtctgtgttcattca
 gagatgatgcacctaaccctcaagagactgcaggcccgagggaatttagaggccaggatt
 ccaatgggtcatagaagcaactgttgattcaagaaaactggggagcctgatgctattgcc
 ttgggaagtggaaactcagatgggacctgatttgcctgcatattaccgaatgtgtcggt
 taccgagatttgacatagtagtactaccggaggatcccgcaatacctctcctgggcatatat
 ccagaagatgttccaacgtaagaccaggctaccctaaaacagctgaagaacaagattct
 gacctaaaatcccattctcatgaagataatagaagactttaaggagattataacaattca
 cttaaagaaatacaggaaaactcaggcaaacagggtataa

1.17

>NALP13/Py17

MYEFYIHKGY DDVSSDNSRE KIKGEPSECE LGHFPRIPWA NLRAADPLNL SFLLEHFFPK
 GPQWKVVLGI FQTMNLTSLC EKVRAEMKEN VQTQELQDPT QEDLEMLEAA AGNMQTQGCQ
 DPNQEEDEL EETGTVQAQ GCQDPNQEEP EMLEADHRR KYRENMAEL LETWDNISWP
 KDHYVIRNTS KDEHEELQRL LDPNRTAQA QTTVLVGRAG VGKTTLAMRA MLHWANGVLF
 QQRFSYVYFL SCHKIRYMK TTFaelISLD WPDFAPIEE FMSQPEKLLF IIDGFEEIII
 SESRSSESLDD GSPCTDWYQE LPVTILHSL LKKELVPLAT LLITIKTWV RDLKASLVNP
 CFVQITGTFG DDLRVYFMRH FDSSEVEKI LQQLRKNETL FHSCSAPMVC WTVCSCLKQP
 KVRYYDLQSI TQTTTSLYAY FFSNLFSTAE VDLADDSWPG QWRALCSLAI EGLWSMNFTF
 NKEDTEIEGL EVPFIDSLYE FNILQKINDC GGCTTFTHLS PQEFFAAMSF VLEEPREFPP
 HSTKPQEMKM LLQHVLLDKE AYWTFVVLFF FGLLNKNIR ELEDTLHCKI SPRVMEELLK
 WGEELX

>NALP13/Py17.cdna

atgagtgcagtgatccaccctctgacacccccattcccttttcatcctcctccactcac
 agttctcatattccgcccctggacattctcttgcctaccccggtccccatgtgaaaatggg
 gtcattgctgacatgagaaacgtgagccatgaggagctacaacgggtcaagcagctctta
 ctgactgagctcagtagtggcaccatgcccatcacctgggaccaggctcgagacagccagc
 tgggcagagggtggttcatctcttgatagagcggttccctggacgacgcgttgggatgtg
 acttcgaacatctttgccattatgaactgtgataaaatgtgtgttagtccgcagagag
 ataaatgccattctgcctacettggaaccagaggacttgaatgtgggagaaaacacagggtg
 aatctggaggaaggagaatctggtaaaatacggcggtataaatcgaatgtgatggaaaag
 tttttcccatatgggacattacgacttggcctggaaccagagggttcttctaccaa
 ggtgtacacaggcagcaggagtagtaccatgtctgcttctgcccacaaagacccagggt
 agacagcccaagaccgtggccatacaggagctcctgggagcggaaaaacaatcctggcc
 aaaaagggtgatgtttgagtgggccagaaacaagttctacgcccaacagcgtggtgtgct
 ttctacttccattgccaagaggtgaaccagacgacagaccagagcttctccgagctgatt
 gagcaaaagtggcctggatctcaggacctcgtgtcaaagattatgtccaaacccgaccaa
 cttctgctgctcttggtggcttggaggagctcacatctaccctcattgacagactggag
 gacctgagtgaagactggaggcagaaattgcctgggtctgtcctactgagcagttgtctg

Forts. Fig. 1

agcaaaacgatgcttccagaggccacgctactgatcatgataagatttacctcttggcag
acatgcaagcccttgctgaaatgtccctctctcgttaacccttccgggttttaatacagatg
gaaaaaatcaagatattccagatgtattttggacacacagaggaggagaccaagtcttg
agtttcgcatggaaaacacattctcttccatgtgcgggtccctgtggtttgctgg
atggtctgctctggtctgaaacagcaaatggagagaggaaacaatctcacacagtcagtg
ccaaatgccacctctgtgttcgtccggtatatttttagcttgtttccaccagagctgag
aacttttccagaaagatccaccaagcacaactggaaggtctgtgtcacttggccgcagac
agcatgtggcacaggaaatgggtgttaggtaaagaagatcttgaggaaagccaagctggat
cagacgggagtcacgccttccctggcatgagttcttccggagaattgcaggtgaggaa
gaccactatgtctttaccctcgtgacttttcaggaattttttgcggccttgttttatgtt
ctctgtttccacaaagactcaaaaattttcatgtgttgagccacgtgaatatccagcgc
ctgatagcgagtcccagaggaaagcaaaagctatctctctcacatgggacttttcttatte
ggttttctgaacgaggccttgcttccggtgggaacagtcattccaatgcaaggtgtct
ttcggtaataagaggaaactgctgaaagtcatacctctgttgcatataatgtgaccacct
tctccgggagtggtgggtcccgagttattctactgtctgcatgaaatccgggagggaagcc
tttgtaagccaagccctaaatgattatcataaagttgtcttgagaattggcaacaacaaa
gaagttcaagtgctgctttttgcctgaagcgggtgtcaatatttgcatgaggtggaactg
accgtcacctgaacttcataacgtgtggaagctcagctccagctcccatcctggctct
gacctaaaggcgtgtgaatagcaccatgtgaaccaggacttaatcgggtgttttgacggg
aaccagcatctgagatacttggaatacaacatgtggaagtggagtcctaaagctggaag
cttctatgacgggtgctgagatcccccggtgcgctctgagtgctcaggttggagac
tgcttggccaccctagaaatttgactgatcttggaataatcttcaaggttaacgggcat
ctaaagactctcactaagaaaaactccctggagaactgtggggcgtattacctgtct
gtggcccagctggagaggtgtcgcagagtaagatgctgaccacctgagcttggcagaa
aacgccttgaaagatgaaggggccaagcatatttggaatgcctgccacacctgagatgt
cctctgcagaggctggtactgagaagtgtgacttgaccttaattgtgtcaggatag
atctctgcgtctctgtaaaaaataaaacccctgaaaagctcttgacctaaagtttaatagcctg
aaggatgtaggggtgactctgtgtgagggcctgaagaaccctgactgtacattacag
atcctggagctggaaaactgcctgttcacctccatctgctgccaggccatggcttccatg
ctccgcaaaaaccaatctgagacatctggacttgagcaagaatgcgattggagtctat
ggtattctgacctgtgagggccttctcaagccaaaagaagagagaagaggtcattttc
actattcaacaatagccaagatttggaagcacctaagtgtccatcaacagatgaatggata
aagaaatgtggtacttacgcacaatggagtactattcagccatgaaaagaaacttaag
tgtagaacaatggtatcatagaacagcacaactggtgtcaggctcctacttgcctata
ttaccaagaatccacttttccccaaaacctgagctctcagccttgtatcaagatggaa
ggagacaaatcgctacacctttccagctacgggctgcaatgggtgtctctatgagctagac
aaggaagaatttcagacattcaaggaattactaaagaagaatcttcagaatcgaccaca
tgctctattccacagtttgaaatcgagaatgccacgtggaatgtctggcactcctctg
catgagtattatggagcatcgctggcctgggctacgtccattagcatctttgaaaacatg
aacctgcgaacccctctcggaagggcagggatgacatgaaaagacattcaccagaagat
cctgaagcaacgatgactgaccaaggaccaagcaaggaaaaagtgccaggaatttcacaa
gctgtgcaacaagatagtgccacagctgcagagacaaaagaacaagaaatttcacaagct
atggaaacaagaggtgccacagcagcagagacagaagaacaagaaatttcacaagctatg
gaacaagaaggtgccacagcagcagagacagaagaacaaggacatggaggtgacacatgg
gactacaagagtcacgtgatgaccaaattcgctgaggaggaggtgtacgtcgtagtttt
gaaaacactgctgctgactggcgggaaatgcaaacgttgggtggtgttttgattcagac
cgggtggggcttccggcctcgacgggtgttctgcacggaaagttaggaattgggaaatcg
gctctagccagaaggatcgctgtgtgtggcgcaaggtggactctaccagggaatgttc
tctactgctcttcttctccctcttagagagatgcagcggaaggaaggagagcagtgta
gagttcactctccaggagtgggccagactccagggtccgggtgacggagatcatgtccga
ccagaaaggctgtgttcatcattgacgggttcgatgacctgggctctgtcctcaacaat
gacacaaagctctgcaaaagactgggctgagaagcagcctccgttcacctcatacgcagt
ctgctgaggaaggtcctgctccttgagtccttctctgatcgctcaccgtcagagacgtgggc
acagagaagctcaagtcagaggtcgtgtctccccgttacctgttagttagaggaatctcc
ggggaacaaagaaatccacttgcctcttgagcggggattgggtgagcatcagaagacaaa
gggttgcgtgcgatcatgaacaaccgtgagctgctcgaccagtgccaggtgcccgccgtg
ggctctctcatctgctggccctgcagctgcaggacgtgggtgggggagagcgtcgcccc
ttcaacaaaacgctcacaggcctgcacggcgttttgtgtttcatcagctcaccctcga

Forts. Fig. 1

ggcggtgggtccggcgctgtctcaatctggaggaaagagttgtcctgaagcgcttctgcggt
 atggctgtggaggagtggtggaataggaagtcagtggttgacgggtgacgacctcatgggt
 caaggactcggggagtctgagctccgtgctctgtttcacatgaacatccttctcccagac
 agccactgtgaggagtactacaccttcttccacctcagtcctccaggacttctgtgcccgc
 ttgtactacgtgttagagggcctggaaatcgagccagctctctgcccctctgtacgttgag
 aagacaaaagggtccatggagcttaaacaggcaggcttccatatccactcgtttggatg
 aagcggttctgtttggcctcgtgagcgaagacgtaaggaggccactggaggtcctgctg
 ggctgtcccgttcccctgggggtgaagcagaagcttctgcactgggtctctctgttgggt
 cagcagcctaatagccaccacccaggagacacccctggacgccttccactgtcttttcgag
 actcaagacaaagagttgttgccttggcattaaacagcttccaagaagtgtggcttccg
 attaacagaacctggacttgatagcatcttcttctgcccctcagcactgtccgtatttg
 cggaaaattcgggtggatgtcaaagggatcttcccagagatgagtcgctgagggcatgt
 cctgtggtccctctatggatgcccggataagaccctcattgaggagcagtggaagatttc
 tgctccatgcttggcaccacccacacctgcggcagctggacctgggcagcagcatcctg
 acagagcgggccaatgaagacctgtgtgccaagctgaggcatccacacctgcaagatacag
 acctgatgttttagaaatgcacagattaccctgggtgtgcagcacctctggagaatcgtc
 atggccaaccgtaacctaaagatccctcaactggggaggcaccacctgaaggaagaggat
 gtaaggatggcgtgtgaagccttaaaacacccaaaatgtttgttggagctctttgaggctg
 gattgtgtggattgacctgacctgttacctgaagatctcccacaccccttacgacctcc
 ccagcctgaaatctctgagcctggcaggaacaaggtgacagaccaggagtaagtcct
 ctgagtgatgcttgagagctctccagtgccgctgcagaagctgatactggaggactgt
 ggcacacagccacgggttgccagagctgtgacctcagccctcgtcagcaaccggagcttg
 acacacctgtgcttatccaacaacagcctggggaacgaaggtgtaaatctactgtgtcga
 tccatgaggttccccactgtagtctgcagaggtgatgctgaatcagtgccacctggac
 acggctggctgtggtttcttgcacttgcgcttatgggtaactcatggctgacgcacctg
 agccttagcatgaacctgtggaagacaatggcgtgaagcttctgtgaggtcatgaga
 gaacctcttctcatctccaggacctggagttggtaaaagtgtcatctcaccgcgctgctg
 tgtgagagctgtcctgtgtgatctcgaggagcagacacctgaagagcctggatctcacg
 gacaatgcccctgggtgacggtgggttgcctgcactgtgcgagggactgaagcaaaagac
 agtgtctgacgagactcgggttgaaggcatgtggactgacttctgattgctgtgaggca
 ctctccttggcccttcttgcacccggcatctgaccagcttaaacctgggtgcagaaataac
 ttcagtcaccaaggaatgatgaagctgtgttggccttgcctgtcccacgtctaaacta
 cagataattggcaatgactctgaagaaaatgacgttcttcgagaatctgctctagtt
 ttgcttaaaagtcaactgttccaagaacctatcaatgacattaaaggagaacttactgtac
 ctccccaaacctataacacgacccggcacagagactctgaggaaggaattcatggatgg
 actgaaaggctgtggaaatggcagttaccctgtgcaaaataaggaagctgctggaggaagt
 cagctactcaagccccagtgctgaattgacggtagtggcattcttttgatgaagatgac
 cgattggatcttcaagccagcaaaacagtcactcagcaagacagacttacaatctcatg
 gcatcacagaagtcatatcccatcaacctgccacattccgtttggatagaagcactgct
 gacggtgggacgggacacttccacatcggggtcccgcctgtgggctgtagggtgttcagt
 gacgtccctgctttacctgccaggtaagagatgaagtaggtatcctgttcacaacagc
 caaagggtgcagacaacccacgtgtctatcagcagatga

1.18

>NALP14/Py18 (mouse)

MGASLWYGPQ VVPVTGDQKF CLTLTPAHLA DFGFIWYKKE LNKIEFMYFK ELLIHEILQM
 GLKQISWTEV KEASREDLAI LLVKHCDGNQ AWDTTFRVFPQ MIGRNVITNR ATGEIAAHST
 IYRAHLKEKL THDCSRKFNI SIQNFQDEY DHLENLLVPN GTENNPMMV LQGVAGIGKT
 ILLKNLMIVW SEGLVFQNKF SYIFYFCCHD VKQLQTASLA DLISREWPS SAPMEILSQ
 PEKLLFIIDS LEGMEWNVQ QDSQLCYNCM EKQPVNVLLS SLLRKKILPE SLLLISTSCE
 TFKDLKDWIR YTNVRTITGF KENNINMCFH SLFQDRNIAQ EAFSLIRENE QLFTVCQAPV
 VCYMVATCLK NEIESGKDPV SICRRTTSLY TTHILNLFIP HNAQNPSNNS EDLLDNLCLF
 AVEGMWTDIS VFNEEALRRN GIMDSDIPTL LDIGILEQSR ESENSYIFLH PSVQEFCAAM
 FYLLHSEMDH SCQGVYFIET FLFTFLNKIK KQWVFLGCFY FGLLHETEQE KLEAFFGYHL
 SKELRRQLFL WLELLLDTLH PDVKKINTMK FFYCLFEMEE EVFVQSAMNC REQIDVVVKG
 YSDFIVAAYC LSHGSALTDF SISAQMC

>NALP14/Pl8.cdna (mouse)

atgggtgcctccttatggtatgggctcaagttgtaccagtcactgggtgatcaaaagttc
 tgcctcacccttaccacgacacatcttgagattttggctttatatggtactggaaagag

Fords. Fig. 1

ctaaacaagatagaattcatgtattttaaggaattactcatacatgaaattctgcaaatg
 ggtctaaaacagatttcttggaactgaagtaaggaagcatctcggaagaccttgccatc
 ttactggtaaaacattgtgacgggaatcaagcctgggatacgaccttcagagctctccag
 atgattgggaggaatgttatcactaatagggcaacaggagagattgctgcacactcaaca
 atatatcgagctcatttaaaggagaagctgacccatgattgttctagaaagttcaacatc
 agtattcagaatttctccaggatgaatatgatcatcttgagaaccttcttgtaccaaat
 ggaactgaaaaaacaatccaaagatgggtgtctctgcaagggtgtagctggaattggcaagact
 attctgttaaaaaatttaattgattgtctgtcagaaggcctggattttcagaacaaattc
 tcttatatcttctacttctgtctgtcatgatgtgaagcaattgcagacagcaagcctggct
 gatctgatctccagagagtggtcctagccctcagctcccatggaggagatcctatcccaa
 cctgagaaactcttattcatcattgacagcttagaagggatggaatggaatgttacccaa
 caggattcgagctgtgttacaattgcatggagaagcagccagtaaatgtattgtgagc
 agtttgctcaggaagaagataactccctgaatcatctctcctcatctccactagtgtgag
 acttttaaggatttgaaggactggattgagtacacaaatgtgagaacaataaccggattc
 aaggaaaaacaatttaatatgtgtttccacagcttgttccaagataggaaacattgcccag
 gaggccttcagtttgataagagaaaatgagcagctgttctactgtatgtcaggccctgtg
 gctgtctacatgggtggctacttgtcttaaaaatgagatagagagtggaagaccagctc
 tccatctgcccagctaccacctccctgtataccactcacatcttaaatttgttcatcccc
 cacaatgccccaaaatccaagtaacaatagcgaagacctgtggataacttgtgttttcta
 gctgtagagggcatgtggactgatatactgtgtttaatgaggaggctctaaggagaaat
 gggatcatggattctgacatccccacactgtggatattggaattcttgagcagagcagg
 gaattcgaaaattctacatatctctccaccgctgtgtccaggagtctgtgagggccatg
 ttttatctgtacatagtgaattggatcactctgtcagggtgttactttatagaaaca
 ttctgtttacttttctaaacaagatcaaaaaacagtggggttttttgggctgtttcttc
 tttggtcttttacatgaaacagaaagaaagctggaggcatttttggctaccactta
 tctaaagaattaaggcgacagctgtttttgtggctggaactcctattggacactttacat
 cctgacgtaaaaaaaataaataccatgaagttctttactgtctgtttgagatggaagag
 gaagctttgtacagtcagcaatgaactgtagggaacagattgacgttgggttaagggt
 tattctgattttattgttgcctactgcttaagccatggctctgactgacagacttc
 tccatttcagctcaaatgtgtga

1.19 >NALP15/Py19.hs
 LEELKKEEPRKFKHEHLKQMTLQLELKQIPWTEVKKSIREELANLLIKHYEEQQAWNITLRIFQRM
 DRKDLCKMKVMRERTGYT....
 KYTKTYQAHAKQKFSRLWSS KSVTEIHLVF EEEVKQEECD HLDRLFAPKE AGKQPRTVII
 QGPOGIGKIT LLMKLMMAWS DNKIFRDRFL YTFYFCCREL RELPPTSLAD LISREWPDPA
 APITRIVSQP ERLLEVIDSF EELQGGLENEP DSDLCGDLME KRPVQVLLSS LLRKKMLPEA
 SLLIAIKPVC PKELRDQVTI SEIYQPRGFN ESDRLVYFCC PFKDPKRAMB AFNLVRESEQ
 LFSICQIPLL CWILCTSLKQ EMQKGDLAL TCQSTTSVYS SFVFNLFTEP GAEGPTPQTQ
 HQLKALCSLA AEGMWTDTFE FCEDDLRRNG VVDADIPALL GTKILLKYGE RESSYVFLHV
 CIOEFCAALF YLLKSHLDHP HPAVRCVQEL LVANFEKARR AHWIFLGCFL TGLLNKKEQE
 KLDAFFGFQL SQEIKQQIHQ CLKSLGERGN PQGQVDSLAI FYCLFEMQDP AFVKQAVNLL
 QEANFHIIDN VDLVVSAYCL KYCSSLRKLC FSVQNVFKKE DEHSSTSDYS LICWHHICSV
 LTTSGHLREL QVQDSTLSSES TFWTCNQLR HPSCRLQKLG INNVSFSGQS VILLFEVLIFYQ
 PDLKYLSTTL TKLSRDDIRS LCDALNYPAG NVKELALVNC HLSPIDCEVL AGLLTNNKKL
 TYLNVSCNQL DTGVPLLCFA LCSPDVTLVY LMLAFCHLSE QCCEYISEML LRNKSRYLD
 LSANVLKDEG LKTLCEALKH PDCCLDSLCL VKCFITAAGC EDLASALISN QNLKILQIGC
 NEIGDVGVL LCRALHTTDC RLEILGLEEC GLTSTCCKDL ASVLTCSKTL QQLNLTNTL
 DHTGVVVLCE ALRHPECALQ VLGLRKTDPD EETQALLTAE EERNPNLTIT DDCDTITRVE
 I

>NALP15.hs.dna (partial)
 gcccccgga aacctcagc ccccccaac tacggcagta cgagccgggtt aaatcgagc
 agattatcat gttctgtca cgtctctga ggattggtat ctctgtcca gaaaagatgg
 cagcctcttt ctgctctgat ttggtcttat gtggtatctg gaggagctca aaaaggagga
 gttcaggaaa tttaagaac atctcaagca aatgacttgc agctgaactc aagcagattc
 cctggactga ggtcaaaaa agcatcccg gaagaacttg caaacctctt gatcaagcac

Forts. Fig. 1

1.20

tatgaagaac aacaagcttg gaacataacc ttaagaatct ttcaaaagat ggatagaaag
gatctctgca tgaaggtcat gagggagaga acaggatata caaagaccta tcaagctcac
gcaaagcaga aattcagccg cttatggtcc agcaagtctg tcaactgagat tcacctatac
tgtgaggagg aagtcaagca agaagaatgt gaccatttgg accgcctttt tgctcccaag
gaaactggga aacagccacg tacagtgtatt attcaaggac cacaaggaac tcggaaaaaa
cgacactcct gatgaagctg atgatggcct ggtcggacaa caagatcttt cgggataggt
tcgtgtacac gtgctatttc tgctgcagag aactgagg

>NALP12/Py20.mmm*

MTSVRCKLAQ YLEDLEDVDL KKFKMHLEDY PPEKGCIPVP RGQMEKADHL DLATLMIDFN
GEEKAWAMAV WIFAAINRRD LWEKAKKQDP EWNDCCTSHS SMVCQEDSLE EEWMLLGYL
SRISICKKKK DYCKMYRRHV RSRFYSIKDR NARLGESVDL NSRYTQLQLV KEHPSKQERR
HELLTIGRTK MRDSPMSSLK LELLFEPEDG HSEPVHTVVF QGAAGIGKTI LARKIMLDWA
LGKLFKDKFD YLFFIHCREV SLRTPRSLAD LIVSCWPDEN PPVCKILRKP SRILFLMDGF
DELQGAFDEH IGEVCTDWQK AVRGDILLSS LIRKLLPKA SLLITTRPVA LEKLQHLLDH
PRHVEILGFS EAKRKEYFFK YFSNELQARE AFRLIQENEV LFTMCFIPLV CWIVCTGLKQ
QMETGKSLAQ TSKTTTAVYV FFLSSLLQSR GGIEHLFSD YLQGLCSLAA DGIWNQKILF
EECDLRKHGL QKTDVSAFLR MNVQKEVDC ERFYSFST

>NALP12/Py20.cdna

atgacgagtggtccgttgcaagctggctcagtatctagaggaccttgaagatgtggacctc
aagaaattcaaaatgcatttgggaagattaccgcgccgagaaaggctgtatcccagctccc
agggggccagatggagaaggcagatcacttggatctagccacactcatgattgacttcaat
ggcgaggagaaggcctgggccatggctgtgtggatctttgctgcgatcaacaggcgagac
ctctgggaaaaagctaagaaggaccagccagagtggatgacacgtgtacatcacattcc
tctatgggtatgccaggaggacagccttgaagaagagtggatgggttggctgggatattctc
tcccgcatctccatttgtaaaaagaagaaagattactgtaagatgtacagacgacatgtg
agaagcaggttctactctatcaaggacaggaacgcgcgtctaggtgagagtgtggacctc
aacagtcgctacacgcagctccaactggtcaaggagcatccaagcaagcaggagcgggag
catgaactcctgaccatcgccgggactaaaatgcgggacagccccatgagttcccttaag
ctggagctgctgtttgagcccaggagcgggcactcggagcctgtgcacacagtgggtgttc
cagggagcagcagggcatcgggaaaaccatcctagccaggaagattatgttggactgggca
ctgggaaagctcttcaaaagacaaatttgactatttgttctttatccactgccgagaggtg
agcctcaggacgccaaggagtctagcagacctgattgtcagctgctggcctgacccaaac
ccaccagtgtgcaagatcctgcgcaagccttcaggatcctcttctcatggatggcttt
gatgagctacaaggggctttgacgagcacattggggaggtctgcacagactggcaaaag
gctgtgcggggagacattctgctaagcagcctcatccgaaagaaactgctgccaaaggcc
tctctgctcataacgacgagggcggtagccttggagaaactgcagcatctcctggaccac
ccccgccatgtggagatcctaggtttctctgaggccaaaaggaaggagtatttctttaag
tatttctccaacgagctgcaggcccgaggccttcaggctgatccaagagaatgaggtc
ctctttaccatgtgcttcatccccctggtctgctggattgtgtgcacggggctaaagcaa
cagatggagaccgggaagagcctggccagacctccaagaccactacggcgtctacgtc
ttcttctttccagcctgtgcaatcccgggggggcattgaggagcatctcttctctgac
tacctacaggggctctgttcaactggctgcggatggaatttggaaaccagaaaaatcctattt
gaggagtgtgatctgcggaagcagcgcctgcagaagactgacgtctccgcttctctgagg
atgaacgtgttccagaagggaagtggactgcgagagattctacagcttcagcacatga

Fig. 2

The PYD family summary

A) Human proteins cloned and sequenced in our laboratory (NALP6 only partially)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Pyrin ✓		No EST	From N. Tidow	16p13.3	PYD; B-Box; SPRY
Pycard ✓		>40	From ESTs	16	PYD; CARD
Pyc ✓		>3	From EST	16	PYD
NALP1 ✓		>20	From Kiaa		PYD; NACHT; LRR; X; CARD
NALP2 ✓	Py7	>30	From NEDO	19	PYD; NACHT; LRR
NALP6 ✓	Py9	>10	From EST (partial)	11	PYD; NACHT; LRR

B) Human proteins partial sequences from genomic databases matching public ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP3 ✓	Py5	>3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP7 ✓	Py11	3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP10 ✓	Py14	1		2	PYD; NACHT; LRR
NALP11 ✓	Py15	3		19	PYD; NACHT; LRR
NALP15 ✓	Py19	>3		19	PYD; NACHT; LRR

Forts. Fig. 2

C) Human proteins partial sequences from genomic databases matching no public human ESTs

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
NALP4 ✓	Py6	1 pot from mouse		11	PYD; NACHT; LRR
NALP5 ✓	Py8			19	PYD; NACHT; LRR
NALP8 ✓	Py12			19	PYD; NACHT; LRR
NALP9 ✓	Py13			19	PYD; NACHT; LRR
NALP13 ✓	Py17			19	PYD; NACHT; LRR
Py10 ✓				11 or 3	PYD

D) Mouse "new" proteins partial sequences from genomic databases matching no public ESTs apparently (1 est for NALP14 and 1 EST in a human sequence for NALP12 but no PYD for the moment in this partial human sequence)

Name	Old Name	EST	sequence	Chr. Locat.	Description
Py16 ✓					PYD interesting to follow
NALP12 ✓	Py20	-			PYD; NACHT; LRR
NALP14 ✓	Py18	1			PYD; NACHT; LRR

25/45

```
ID PYD_DOMAIN; MATRIX.
AC ZZ99999;
DT Mon Oct 30 13:50:41 2000
DE Generated from MSF file: 'stdin'.
MA /GENERAL_SPEC: ALPHABET='ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ';
LENGTH=82;
MA /DISJOINT: DEFINITION=PROTECT; N1=6; N2=77;
CC Automatic scaling using medium database
MA /NORMALIZATION: MODE=1; FUNCTION=LINEAR; R1=1.0442;
R2=0.01858709; TEXT='NScore';
MA /CUT_OFF: LEVEL=0; SCORE=401; N_SCORE=8.5; MODE=1;
MA /CUT_OFF: LEVEL=-1; SCORE=293; N_SCORE=6.5; MODE=1;
MA /DEFAULT: M0=-8; D=-20; I=-20; B1=-60; E1=-60; MI=-105;
MD=-105; IM=-105; DM=-105;
MA /I: B1=0; BI=-105; BD=-105;
MA /M: SY='L'; M=-11,-28,-22,-29,-20,12,-29,-16,15,-
26,38,18,-28,-29,-17,-18,-28,-11,5,-9,7,-18;
MA /M: SY='E'; M=-10,11,-28,19,39,-27,-17,-1,-29,10,-22,-
19,2,-5,13,4,2,-7,-26,-28,-15,26;
MA /M: SY='E'; M=-12,22,-26,22,26,-24,-13,3,-26,3,-23,-
18,20,-11,13,-1,2,-7,-28,-31,-16,20;
MA /M: SY='L'; M=-9,-30,-20,-31,-22,8,-31,-22,24,-
29,42,19,-29,-29,-21,-21,-27,-9,17,-21,-1,-22;
MA /M: SY='S'; M=-2,5,-19,3,2,-21,-2,-8,-20,-4,-22,-16,10,-
11,-2,-5,14,6,-15,-33,-18,0;
MA /M: SY='E'; M=0,2,-27,5,11,-30,-12,-2,-25,10,-24,-
13,0,1,10,1,0,-7,-21,-26,-15,9;
MA /M: SY='D'; M=-14,17,-29,26,26,-25,-18,-1,-24,5,-20,-
18,5,-10,6,-3,-3,-9,-21,-28,-10,15;
MA /M: SY='E'; M=-11,18,-28,24,45,-30,-16,2,-29,7,-23,-
20,11,-5,17,-1,2,-8,-30,-32,-20,31;
MA /M: SY='L'; M=-12,-28,-19,-31,-22,30,-28,-19,11,-
29,33,11,-24,-29,-25,-19,-23,-8,6,-12,8,-22;
MA /M: SY='K'; M=-11,1,-28,1,10,-26,-17,-3,-24,20,-22,-
7,1,-13,15,19,-3,-8,-20,-18,-10,12;
MA /M: SY='K'; M=-10,-2,-26,-1,10,-23,-18,-6,-26,28,-24,-
12,0,-12,8,26,-2,-2,-18,-22,-8,7;
MA /M: SY='F'; M=-19,-28,-21,-37,-27,70,-29,-19,-1,-
25,9,0,-19,-29,-36,-17,-20,-10,-1,7,26,-27;
MA /M: SY='K'; M=-10,-2,-30,-3,8,-29,-21,-9,-25,41,-26,-7,-
1,-11,13,26,-10,-10,-18,-20,-9,10;
MA /M: SY='F'; M=-9,-12,-23,-13,-1,2,-21,-5,-7,-7,-2,0,-9,-
17,-4,-7,-6,-5,-8,-18,1,-2;
MA /M: SY='Y'; M=-12,-18,-25,-19,-11,6,-21,-10,-6,0,7,2,-
16,-23,-11,0,-19,-11,-6,-9,10,-11;
MA /M: SY='L'; M=-10,-28,-21,-28,-16,7,-30,-20,20,-
28,43,18,-27,-27,-18,-20,-27,-10,10,-21,-1,-17;
MA /M: SY='R'; M=-3,-13,-26,-14,-8,-17,-5,-12,-16,-1,-10,-
7,-9,-12,-4,1,-7,-7,-13,-15,-12,-7;
```

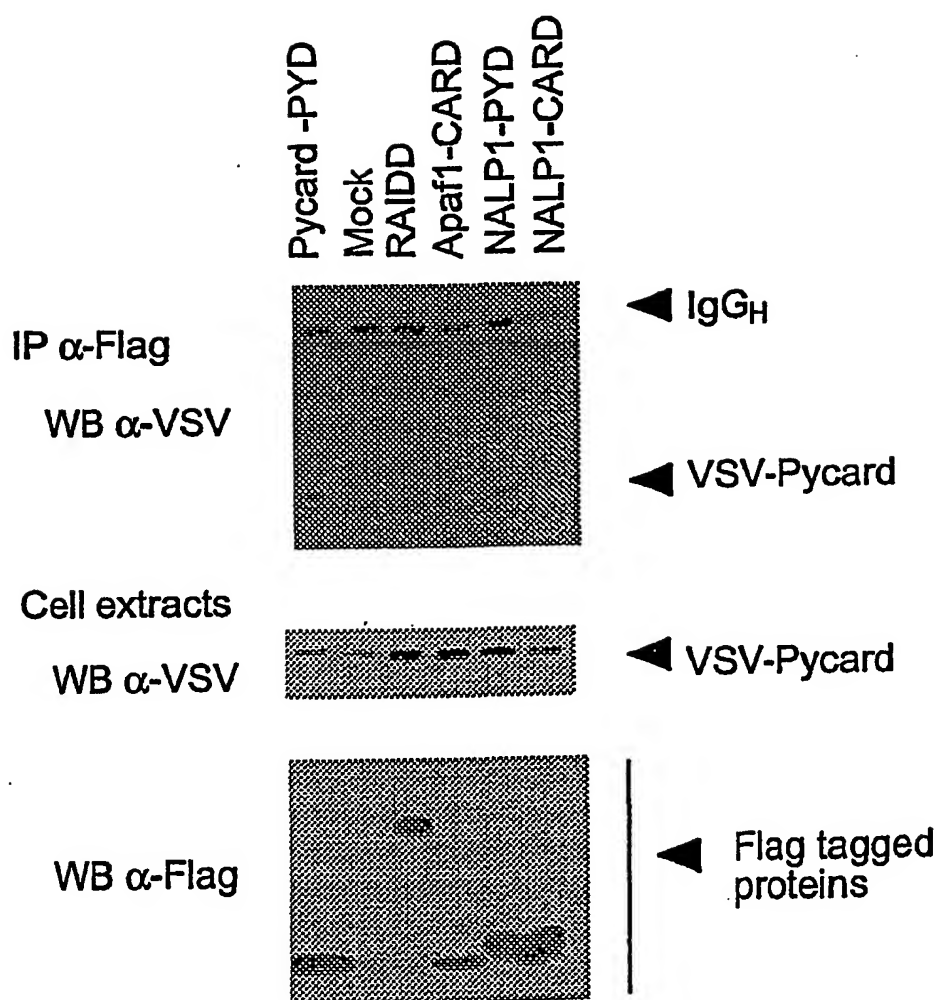
MA /M: SY='B'; M=-6,15,-20,14,5,-23,-13,-3,-23,0,-21,-
 16,11,-12,2,-1,10,12,-17,-32,-14,3;
 MA /M: SY='E'; M=-4,-9,-22,-10,5,-10,-21,-13,-10,3,-10,-5,-
 9,-10,-4,1,-4,-1,-5,-22,-10,0;
 MA /I: I=-4; MD=-18;
 MA /M: SY='P'; M=0,-9,-18,-10,-5,-14,-9,-13,-6,-6,-11,-7,-
 5,5,-4,-7,3,1,-6,-21,-12,-6; D=-4;
 MA /I: I=-4; MD=-18;
 MA /M: SY='L'; M=-8,-18,-10,-19,-11,-3,-24,-9,6,-18,19,10,-
 18,-23,-8,-13,-15,-5,3,-23,-4,-10; D=-4;
 MA /I: I=-4; MD=-18;
 MA /M: SY='E'; M=-5,4,-23,8,23,-26,-10,-3,-25,7,-21,-15,2,-
 7,13,8,4,-5,-21,-26,-16,17; D=-4;
 MA /I: I=-4; MD=-18;
 MA /M: SY='E'; M=-10,-6,-22,-4,6,-7,-18,-4,-13,0,-6,-4,-6,-
 5,-2,-1,-7,-5,-12,-20,-6,2; D=-4;
 MA /I: I=-4; MD=-18;
 MA /M: SY='G'; M=-3,-2,-23,1,3,-23,21,-11,-27,-4,-21,-
 15,0,-12,-5,-7,1,-8,-19,-22,-20,-1; D=-4;
 MA /I: I=-4; MD=-18;
 MA /M: SY='H'; M=-9,-10,-19,-11,-6,-1,-15,11,-6,-12,3,1,-
 8,-17,-4,-8,-8,-3,-8,-14,8,-6; D=-4;
 MA /I: I=-4; MI=0; MD=-18; IM=0; DM=-18;
 MA /M: SY='P'; M=-6,-10,-21,-9,-4,-20,2,-11,-22,-3,-22,-
 10,-5,4,0,-5,-1,-8,-20,-23,-17,-3; D=-4;
 MA /I: I=-4; DM=-18;
 MA /M: SY='R'; M=-10,-5,-26,-6,1,-22,-12,-6,-23,14,-21,-
 11,0,-2,6,23,-3,-4,-19,-23,-14,1; D=-4;
 MA /I: I=-4; DM=-18;
 MA /M: SY='I'; M=-8,-26,-25,-32,-23,-1,-35,-27,36,-
 25,17,14,-20,-21,-19,-25,-16,-4,25,-23,-3,-24;
 MA /M: SY='P'; M=-2,-14,-30,-10,-2,-25,-17,-18,-18,-8,-25,-
 17,-13,54,-8,-14,0,2,-21,-29,-25,-9;
 MA /M: SY='W'; M=-16,-19,-37,-19,-8,-12,-20,-9,-22,3,-19,-
 12,-16,-16,3,11,-19,-15,-24,42,5,-2;
 MA /M: SY='G'; M=5,-4,-20,-7,-11,-14,17,-16,-24,-12,-21,-
 16,2,-16,-13,-14,9,1,-15,-24,-17,-11;
 MA /M: SY='E'; M=1,2,-24,3,22,-26,-15,-3,-22,5,-18,-13,0,-
 2,13,0,3,-4,-21,-27,-17,17;
 MA /M: SY='L'; M=-7,-29,-19,-31,-24,3,-30,-23,26,-
 25,27,17,-27,-22,-21,-21,-21,-7,24,-24,-5,-24;
 MA /M: SY='E'; M=-12,3,-29,8,24,-24,-18,0,-21,8,-13,-10,-
 2,-10,10,4,-7,-11,-20,-26,-12,16;
 MA /M: SY='K'; M=-5,0,-25,-2,9,-26,-14,-6,-23,20,-21,-7,1,-
 11,13,14,-1,-2,-18,-23,-12,11;
 MA /M: SY='A'; M=28,-14,-13,-23,-13,-11,-9,-17,0,-13,5,6,-
 14,-15,-10,-18,-1,-1,3,-20,-13,-12;
 MA /I: I=-6; MI=0; MD=-32; IM=0; DM=-32;
 MA /M: SY='D'; M=-10,23,-23,27,5,-27,-6,-4,-26,-1,-26,-
 21,18,-13,-1,-1,9,0,-21,-36,-18,1;

MA /M: SY='P'; M=-4,-13,-31,-11,-2,-23,-3,-15,-22,0,-22,-
14,-10,12,-6,0,-7,-12,-20,-15,-18,-6;
MA /M: SY='I'; M=-5,-15,-24,-16,-1,-11,-27,-17,9,-6,5,5,-
15,-16,-7,-11,-12,-8,8,-24,-9,-5;
MA /M: SY='D'; M=-14,26,-24,35,24,-35,-15,0,-32,8,-26,-
20,12,-10,12,-1,-1,-9,-28,-33,-18,18;
MA /M: SY='L'; M=-8,-29,-18,-30,-22,7,-29,-20,22,-
27,40,21,-29,-29,-20,-19,-26,-8,17,-22,-2,-21;
MA /M: SY='A'; M=31,-12,-10,-19,-13,-15,-9,-21,-3,-12,-7,-
7,-11,-14,-13,-18,10,9,9,-25,-17,-13;
MA /M: SY='D'; M=-11,14,-25,16,14,-19,-16,1,-21,-1,-18,-
15,10,-12,3,-4,2,-2,-20,-30,-12,8;
MA /M: SY='L'; M=-10,-24,-23,-26,-16,2,-30,-17,15,-
16,28,14,-23,-25,-13,-13,-23,-9,8,-18,2,-15;
MA /M: SY='L'; M=-10,-29,-20,-30,-20,12,-29,-17,19,-
27,44,24,-28,-29,-18,-19,-28,-10,10,-19,1,-19;
MA /M: SY='V'; M=-4,-16,-20,-17,-18,-8,-27,-19,15,-16,3,4,-
17,-16,-18,-18,-9,-1,20,-28,-9,-19;
MA /M: SY='S'; M=1,2,-20,-1,7,-22,-10,-9,-17,2,-20,-12,5,-
10,6,-3,10,7,-14,-29,-15,6;
MA /M: SY='H'; M=-13,-6,-24,-9,-7,-1,-21,29,-15,-6,-13,-
4,0,-21,0,-1,-4,-4,-15,-14,20,-6;
MA /M: SY='Y'; M=-13,-20,-12,-24,-21,31,-26,2,-5,-16,-2,-
4,-17,-28,-18,-15,-12,-7,-7,10,45,-21;
MA /M: SY='G'; M=-6,-7,-21,-4,-5,-22,11,-15,-24,-14,-18,-
15,-6,1,-12,-16,-3,-7,-21,-26,-20,-9;
MA /M: SY='E'; M=1,-1,-25,3,18,-27,5,-10,-28,-1,-24,-19,-
1,0,2,-8,7,-6,-23,-28,-22,9;
MA /I: I=-6; MD=-32;
MA /M: SY='E'; M=-8,2,-25,2,10,-21,-7,-3,-21,7,-20,-12,3,-
13,7,4,0,-6,-19,-21,-7,8; D=-6;
MA /I: I=-6; MI=-32; IM=-32; DM=-32;
MA /M: SY='Y'; M=-15,-8,-32,-5,0,-8,-21,0,-17,1,-14,-10,-
10,-15,5,2,-12,-11,-20,12,17,1;
MA /M: SY='A'; M=37,-13,-14,-21,-14,-18,2,-21,-5,-13,-8,-
7,-11,-13,-13,-21,5,-3,2,-20,-19,-14;
MA /M: SY='W'; M=-8,-30,-31,-30,-22,1,-18,-25,-4,-17,-4,-
7,-29,-27,-19,-15,-23,-16,-2,51,7,-19;
MA /M: SY='E'; M=-8,10,-24,12,14,-24,-13,-2,-21,7,-19,-
8,7,-11,8,4,2,-5,-19,-30,-15,11;
MA /M: SY='V'; M=2,-23,-15,-26,-20,-2,-24,-21,15,-
16,17,12,-23,-24,-18,-16,-12,0,20,-24,-7,-19;
MA /M: SY='T'; M=10,-7,-11,-14,-12,-11,-16,-20,-4,-12,-6,-
7,-6,-14,-12,-14,14,28,6,-29,-12,-12;
MA /M: SY='L'; M=-7,-26,-19,-30,-22,11,-28,-20,18,-
23,23,15,-23,-26,-20,-16,-18,-7,15,-19,0,-21;
MA /M: SY='N'; M=-6,7,-24,4,6,-26,-8,2,-24,8,-24,-13,12,-
13,11,8,6,-1,-22,-28,-14,8;
MA /M: SY='I'; M=-5,-25,-21,-31,-27,-2,-29,-28,31,-
24,12,11,-20,-22,-22,-24,-11,0,29,-24,-6,-27;

Fig. 3/3

```
MA /M: SY='F'; M=-16,-30,-21,-36,-26,47,-30,-20,8,-
30,26,8,-25,-30,-31,-20,-25,-11,3,4,17,-25;
MA /M: SY='R'; M=-8,-2,-27,0,18,-26,-15,-2,-25,15,-19,-11,-
1,-11,18,22,-2,-8,-22,-24,-14,16;
MA /M: SY='K'; M=-4,2,-24,1,2,-23,-13,-8,-16,8,-15,-4,0,-
14,4,4,-4,-5,-12,-25,-13,2;
MA /M: SY='M'; M=-7,-22,-21,-31,-21,-1,-24,-10,24,-
16,19,43,-19,-20,-7,-16,-18,-7,14,-20,-1,-15;
MA /M: SY='N'; M=-10,21,-25,11,-2,-24,9,5,-27,3,-29,-
18,34,-19,-2,5,3,-7,-28,-32,-18,-3;
MA /M: SY='L'; M=-10,-18,-5,-21,-12,-8,-25,-12,-5,-6,6,3,-
15,-25,-5,5,-16,-10,-5,-22,-5,-10;
MA /M: SY='R'; M=-11,2,-24,-1,3,-19,-18,-3,-17,10,-13,-
3,5,-15,8,15,-3,0,-15,-26,-11,4;
MA /M: SY='D'; M=-5,12,-24,18,16,-26,-15,-2,-22,-1,-16,-
15,3,-11,4,-7,2,-4,-17,-31,-15,10;
MA /M: SY='L'; M=-9,-28,-19,-29,-19,6,-29,-19,21,-
26,39,21,-28,-28,-18,-19,-25,-9,15,-22,-2,-19;
MA /M: SY='C'; M=16,-15,25,-22,-17,-16,-13,-22,-15,-17,-
15,-12,-13,-21,-16,-21,3,-1,-4,-19,-18,-16;
MA /M: SY='E'; M=-2,6,-25,10,25,-26,-10,-7,-25,7,-20,-
16,1,-8,6,1,0,-7,-20,-28,-18,15;
MA /M: SY='R'; M=-13,-2,-29,-1,12,-27,-20,-1,-23,21,-19,-
6,-2,-13,20,28,-6,-9,-19,-23,-11,15;
MA /M: SY='L'; M=13,-22,-16,-26,-18,-4,-16,-22,9,-21,19,6,-
21,-22,-17,-21,-12,-6,10,-21,-10,-18;
MA /M: SY='Q'; M=-11,-4,-27,-4,5,-25,-18,2,-17,8,-14,-3,-
2,-15,21,14,-5,-7,-18,-23,-8,11;
MA /M: SY='E'; M=-5,3,-27,6,17,-26,-8,-2,-29,11,-21,-15,1,-
11,6,13,-2,-9,-22,-25,-16,11;
MA /M: SY='E'; M=-5,5,-27,6,22,-24,-13,-1,-20,2,-17,-13,4,-
9,6,1,-1,-8,-19,-28,-15,13;
MA /M: SY='M'; M=-2,-17,-6,-25,-18,-9,-23,-16,6,-10,2,14,-
14,-20,-9,-7,-8,0,7,-25,-9,-15;
MA /M: SY='N'; M=-3,1,-22,-4,1,-16,-15,-7,-10,3,-8,-3,5,-
17,-2,2,-5,-6,-9,-27,-13,0;
MA /M: SY='H'; M=-6,1,-28,3,21,-26,-11,24,-28,2,-20,-11,2,-
11,15,4,-3,-12,-26,-26,-8,16;
MA /M: SY='S'; M=-3,-1,-19,-4,-7,-18,-1,3,-17,-6,-21,-
12,9,-18,-5,-1,10,0,-9,-32,-14,-7;
MA /M: SY='V'; M=-4,-21,-18,-23,-22,6,-2,-22,0,-22,1,-2,-
16,-25,-24,-19,-6,-5,9,-20,-8,-22;
MA /I: E1=0; IE=-105; DE=-105;
CC /GENERATED_BY="/usr/molbio/bin/pfmake -2b -
/usr/molbio/share/pftools/blosum45.cmp H=0.6";
//
```

Fig. 4



A

Pycard HS 12: LELIPFAELKFKLILSVLP . REGYGRIPGALSMD.A DLTDKLV FYLET AELTA VLVD GLDE AGQMQA T:89
 Pyrin HS 13: LEEIVPYEFKFKFKIONTSS . Q EHSRIP SQIO A . P K ATLLV YVGEF AVQTLT VLRL NQRLAE LHR A:90
 NALP1 HS 13: LEFIFKKEL EFQLL NKASHRSSGETPQPEKTS . ASYLVAQYGEQRWDLALHTWEQ GLRSTCAQAOK A:90
 NALP2 HS 13: LELISQDELSKRYL TFS . A ELQ IP KE KAD GKQLV LT HCDSY VEMAL VFEL RMDL ERAKE EV:90
 Caspy DR 13: LS CAD L FQS T D . . . R QEP R STI K DE DLVDLLNT TS.DAVS T D LRR CIA AE LL NT:87
 Pycard DR 13: FEDIGAD LKFKSKL D . . . R QEP R T SAI K DE DIADLVGV TSKDAVS T E LRR CIA A L LRNT:88
 consensus 1:*****!*****-----*****-----*****:80

B

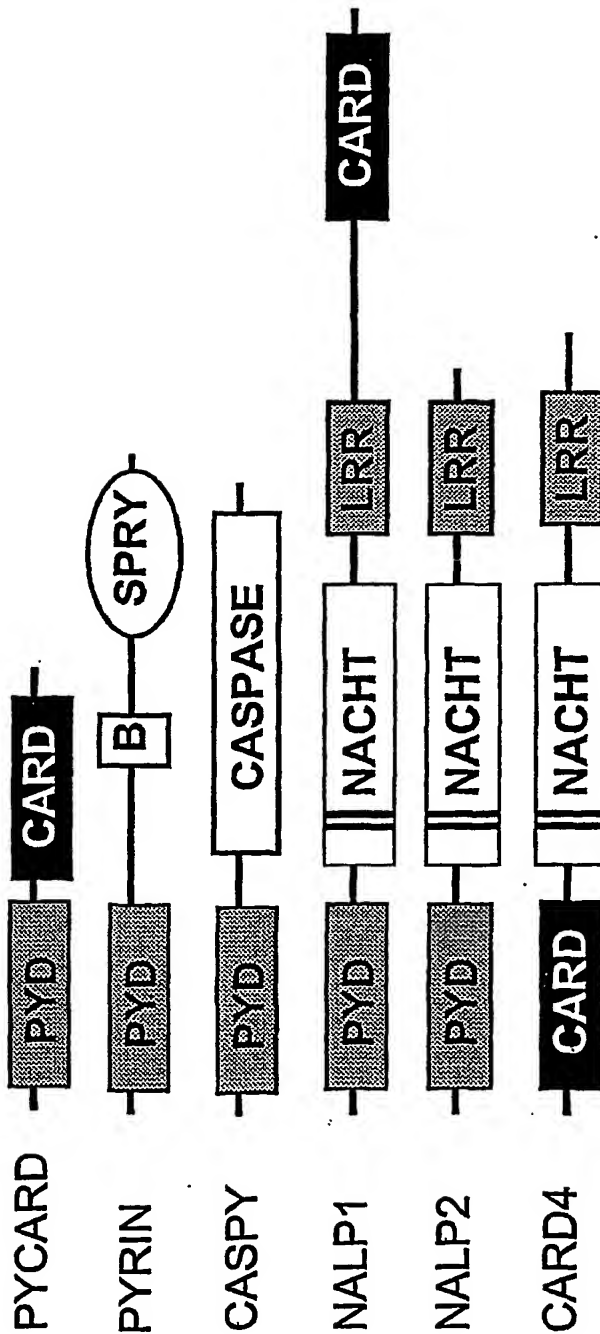


Fig. 5

MAGGAWRLACY
 TSGRRWREISALLYQALPSSPDHESPSQESPNAPTSTAVLGSWGSPPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDE
 TSGIYYTEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHTSLQPHHHPWEPVSRESLCSITWPNKNEDEFNQKFTQ
 LLLQRPSPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGHLIEIRDI
 WGRGQLYGDRFQHVYFSCRELAQSKVVSALAEIGKDGATAPAPIRQILSRPERLLFILDGVDPEPGWVLQ
 EPSSELCLHWSQPQADALLGSLGKTLPEASFLITARTTALONLIPSLAQARWVEVLGFSESSRKEYF
 YRYFTDERQATRAFRVLKSNKELWALCLVPWVSWLACTCLMQQMKRKEKLTLSKTTTTLCLHYLAQALQ
 AQPLGPQLRDLCSLAAGIOWKKTLESPDDLKXGHLDGAIISTFLKMGILQEHPIPLSYSFHLCFQEFF
 AAMSYYLEDEKGRGKHSNC
 MQVPSLQLLQPHSLESCHLYETRNTFTLTQVMAHFEEMGMCVETDMELLVCTFCIKFSRHVKKLQLI
 EGRQHRSTWSPTMVLFRWVPVTDAYWQILFSVLK
 GODLASVLSASPSEKEHLEQONNEDVGVRLCEGERH
 LLIFRRRKPSVMTPTTEGLDTGEMSNSTSLKRQRLGSERAASHVAQANLKLDDVSKLFFPLAEIAEESSPE
 VVPVELLCVPSPASQGDHLTKPLGTTDDDFWGPTGPVATEVVDKEKNLYRVHFPVAGSYRWPNTGLCFVMR
 EAVTVEIEFCVWDQFLGEINPQHSWMVAGPLLDIKAEPGAVEAVHLPHFVALQGGHVDTSLFQMAHFKEE
 GMLLEKPARVELHHIVLENPSFSPLGVLLKMIHNALRFIPVTSVLLYHRVHPEEVTFFHLYLIPSDCSIR
 KELELCYRSPGEDQLFSEFYVGHLCGSGIRLQVKDKDETIVWEALVKPGDIMPATLLIPPARIAVPSPLD
 APQLLHEFVDQYREBQLIARVTSVEVVLKHLHGQVLSQEQYERVLAEINTRPSOMRKLESLSQSWDRKCKDGL
 YQALKETHPHILIMELKSGSKGLPLSS

PYD	Pycard	HS	12: L ENL PA E E K K F K L K I L S V P E R E . G Y G R I P . G A L E S M I A . D L T D K L V S F L E T Y G A S L T . A . N M E R D . G I Q E M A G C H Q A A T
	Pytrin	HS	13: L E E L P Y D F E K F K F K L Q N T S . Q . K . E H S R I P . S Q I Q S A R P . K M A T L E T Y . G E E Y A V Q L T . L . Q . M E R A . N Q R L L A E E . H R A A
DED	Caspas 8	HS	1: M D . . F S R N Y D . G E Q M D S E D F A S L K F . S L D Y P O R . Q . P . K D A L M I F O R L Q E K R M L . E S N L . S F . K E . L . F R I N R L D L L I T Y
	FADD	HS	1: M D D P F L V L . H S . S S S I S S S E T T E L K T . C I G . K . G R . L . R . Q S G L D F S M L L E Q N D L . P O H T . E . M E R E . L A S L R R H D L L R R
	PER-15	HS	1: M V E . Y G T L F Q D . T N N T L E D L E Q L K S A C K E I . P S E . S . E . T T G S A W F S F L E S H N K L . K D N L . S . M E H . F E I S R R P D L T M V
CARD	APAF-1	HS	5: A N C . L . Q H R E A . E K D . K T S Y I N D H . I . S D G F . T I S . E E . K . A . M . P . T Q Q K A A M L . K M I L K E D N D S Y V . S F Y N A . L . H E G Y K . L . D A A L
	CED-3	CE	5: R R S L . E R N . M M F S S H K V D E I L E V I A K Q V E N D N G . M . N S C G T V R E K R R E L . K A V O R G V A F D . A F Y D A . P R S T G H E . G U A E V
	CED-4	CE	6: E C R A . S T A H T R . I H D F E P R D A L T Y . E G K N I F T E D . S . L . S K M S T R L E R I A N F . R I . R R R Q A S P . M . D F F N Y N N Q S . H E A D F
DED	FAS	HS	204: S D V D . S K Y . T T . T A G V . T L S . Q V K G F V R K N G V N E A . E . E . E . M . N . M . Q D T A . E Q K V Q I . E R N . H Q L H G K K E A Y D . T . M . K D . E K K A N I C . T . P A E K
	FADD	HS	93: G E E D . C A A F N V . C D N I G K D . . W R R . A R Q L K . S D T . S . E D R Y P R N I T . E R V R E S E R I . K N T E K E N A T V A . H A N G A . P R S Q M N . I . M A D I
	RIP	HS	579: T T S L T D K H . D P . R E N P . G K H . . W K N C A R K L G F T Q S Q . E E . E D H . Y E R D G L K E K V Y Q . E L . K . K . V M R E G I K G A T V G M A Q A . H Q C S R I D L . S S I

Fig. 6

Fig. 7

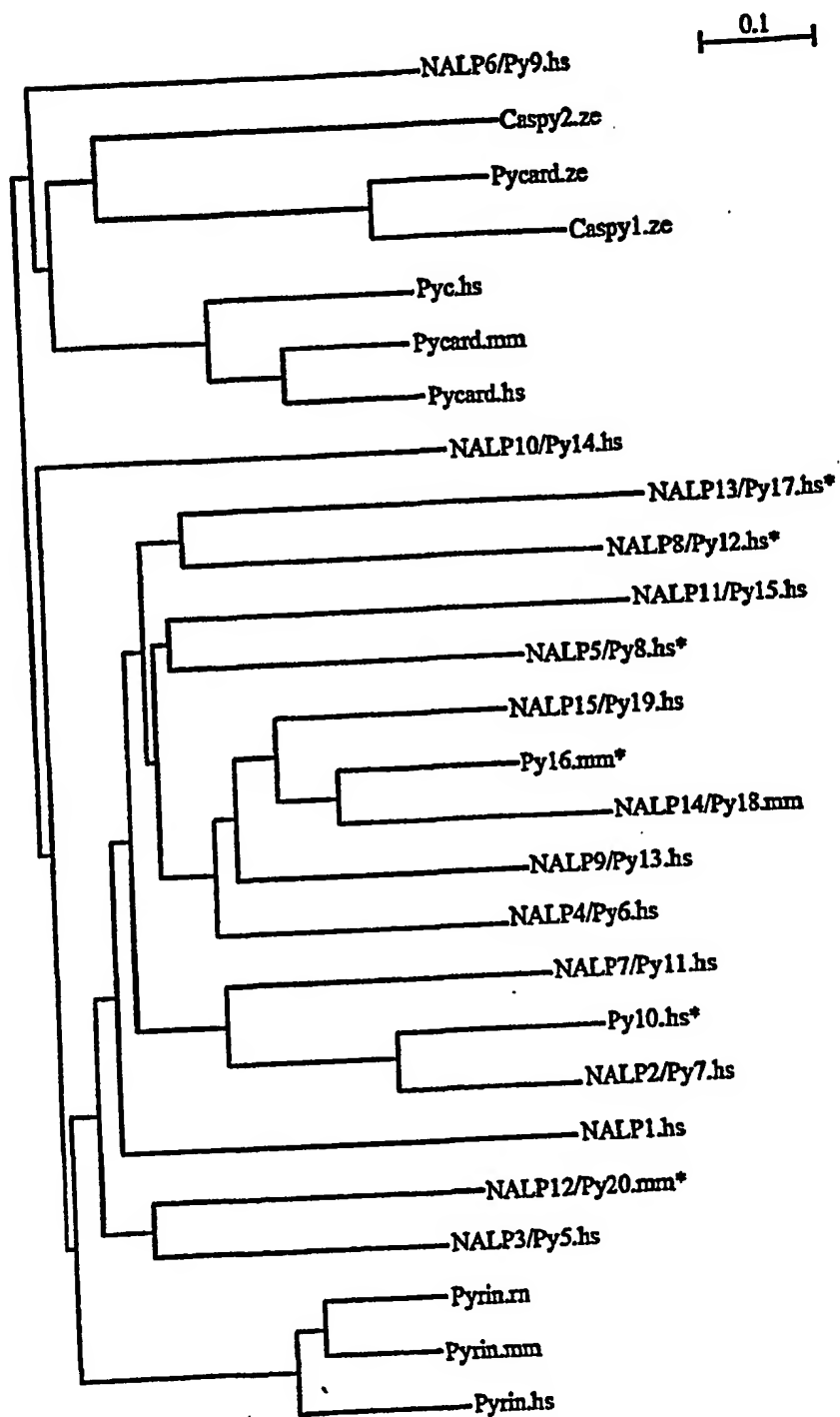


Fig. 8

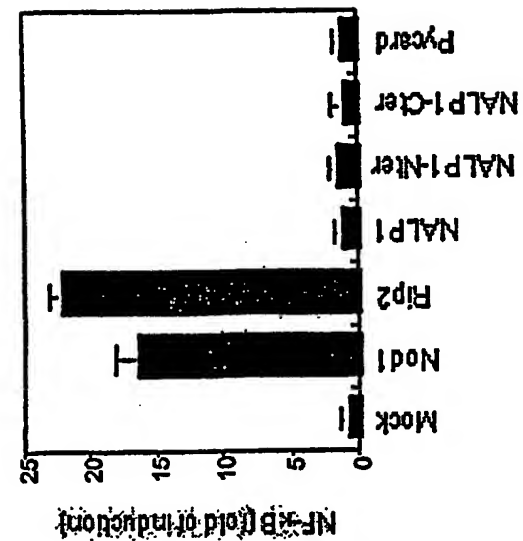
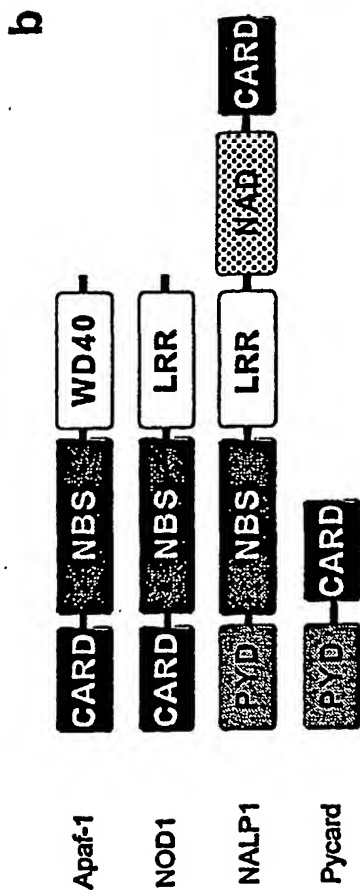
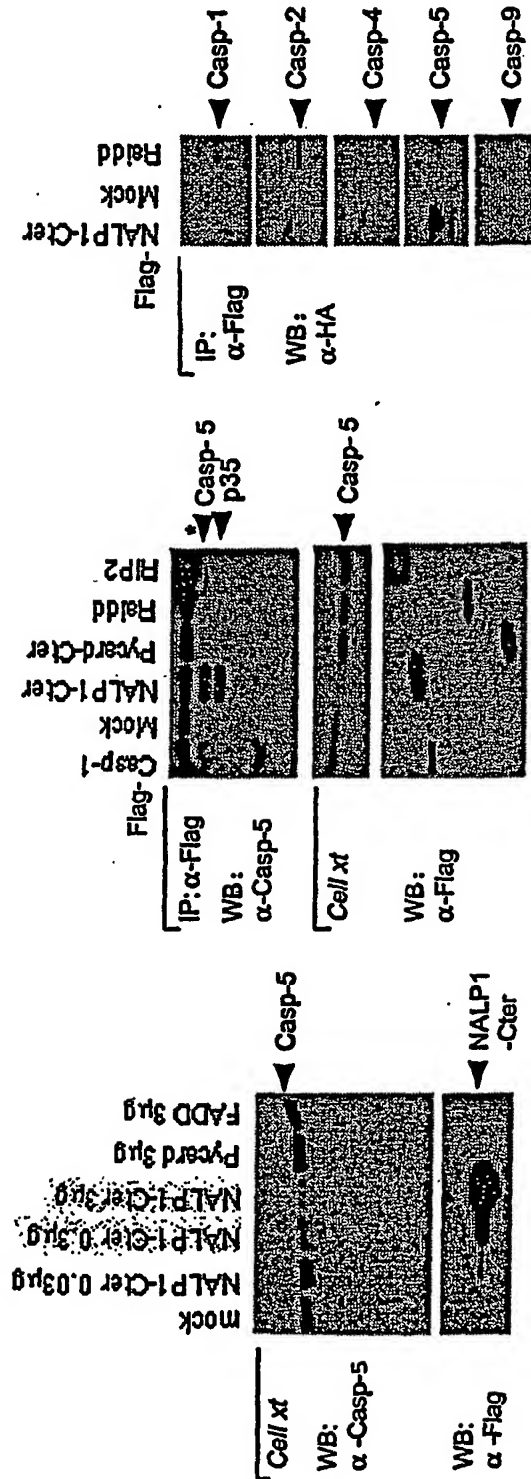


Fig. 9



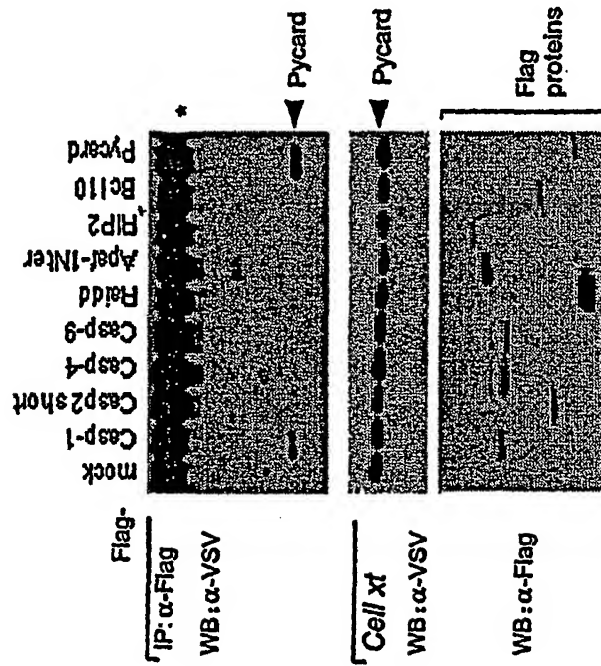
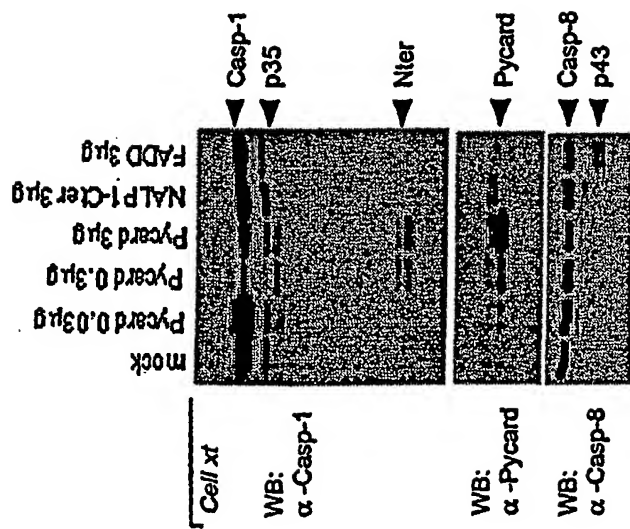
b



Forts. Fig. 9

C

d



Forsts. Fig. 9

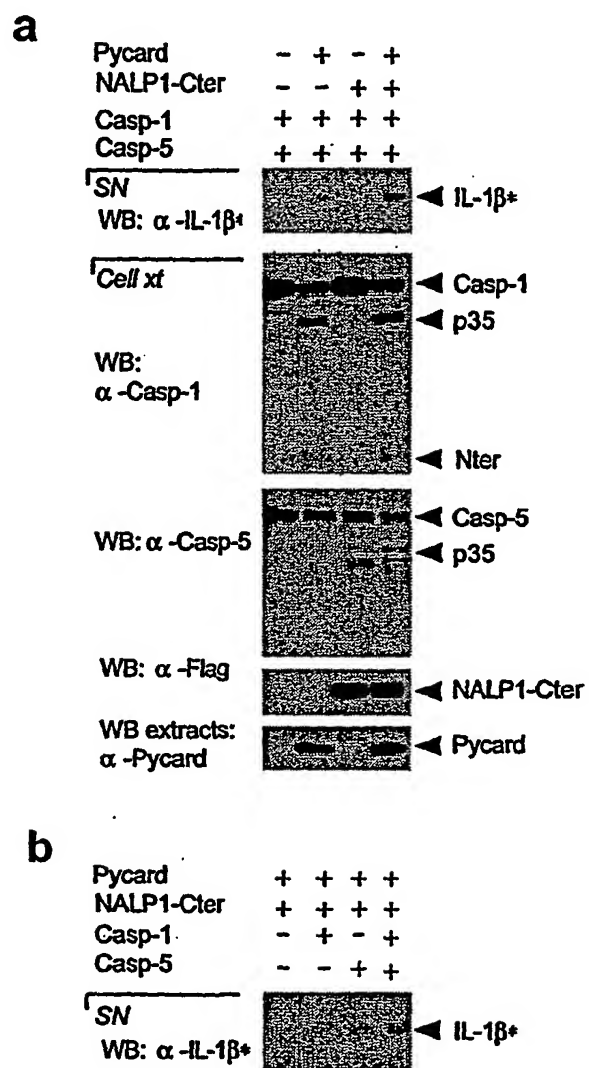


Fig. 10

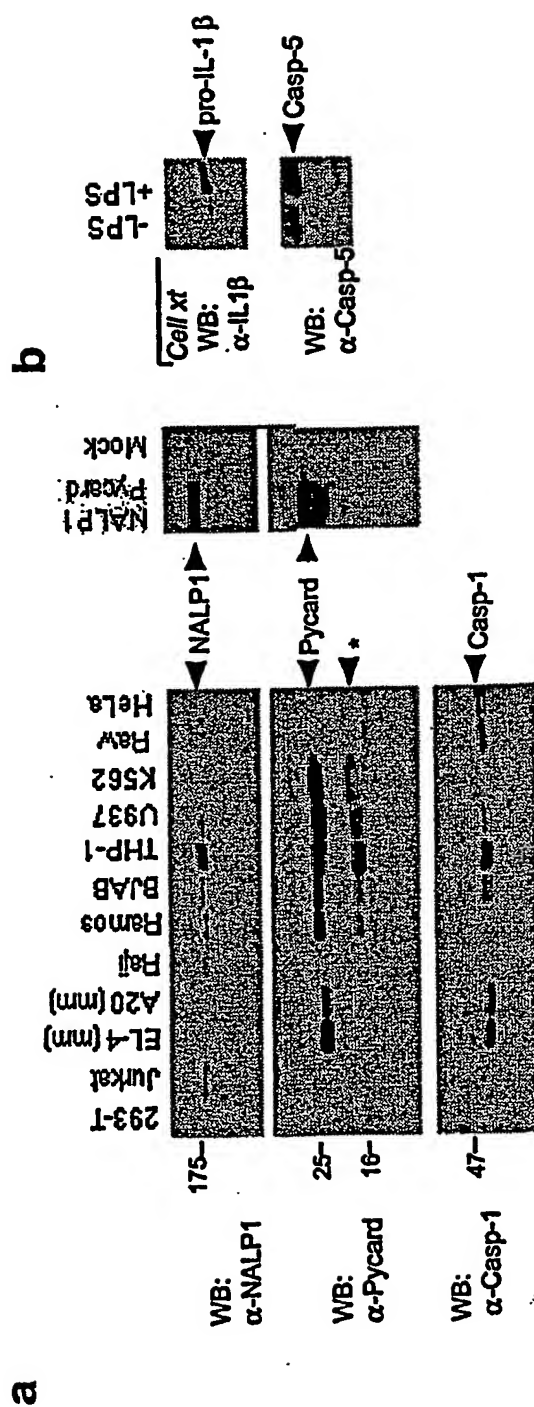
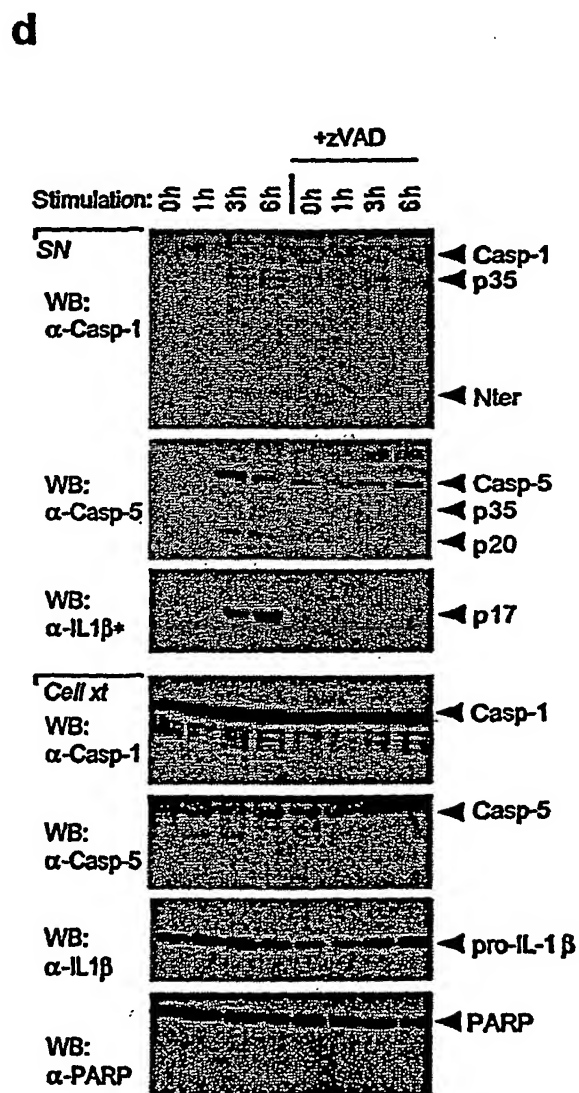
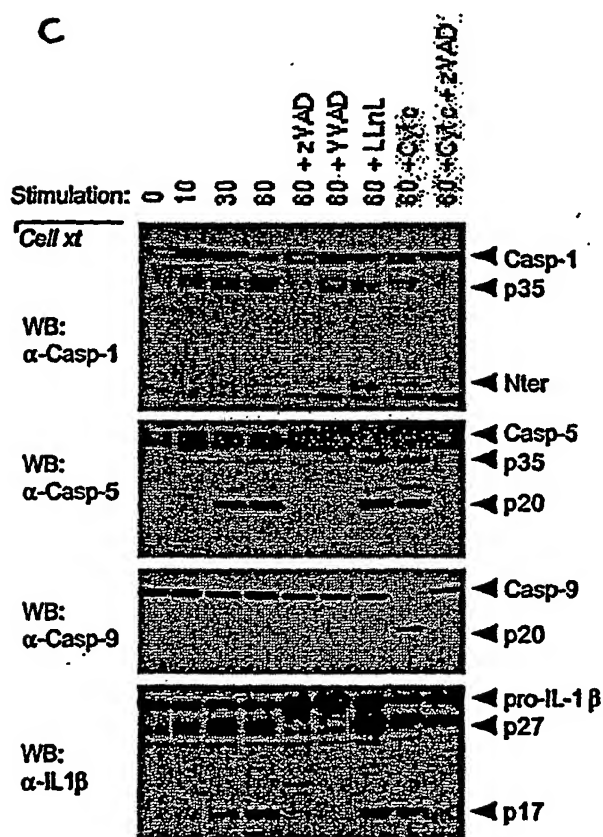


Fig. 11



Forts. Fig. 11

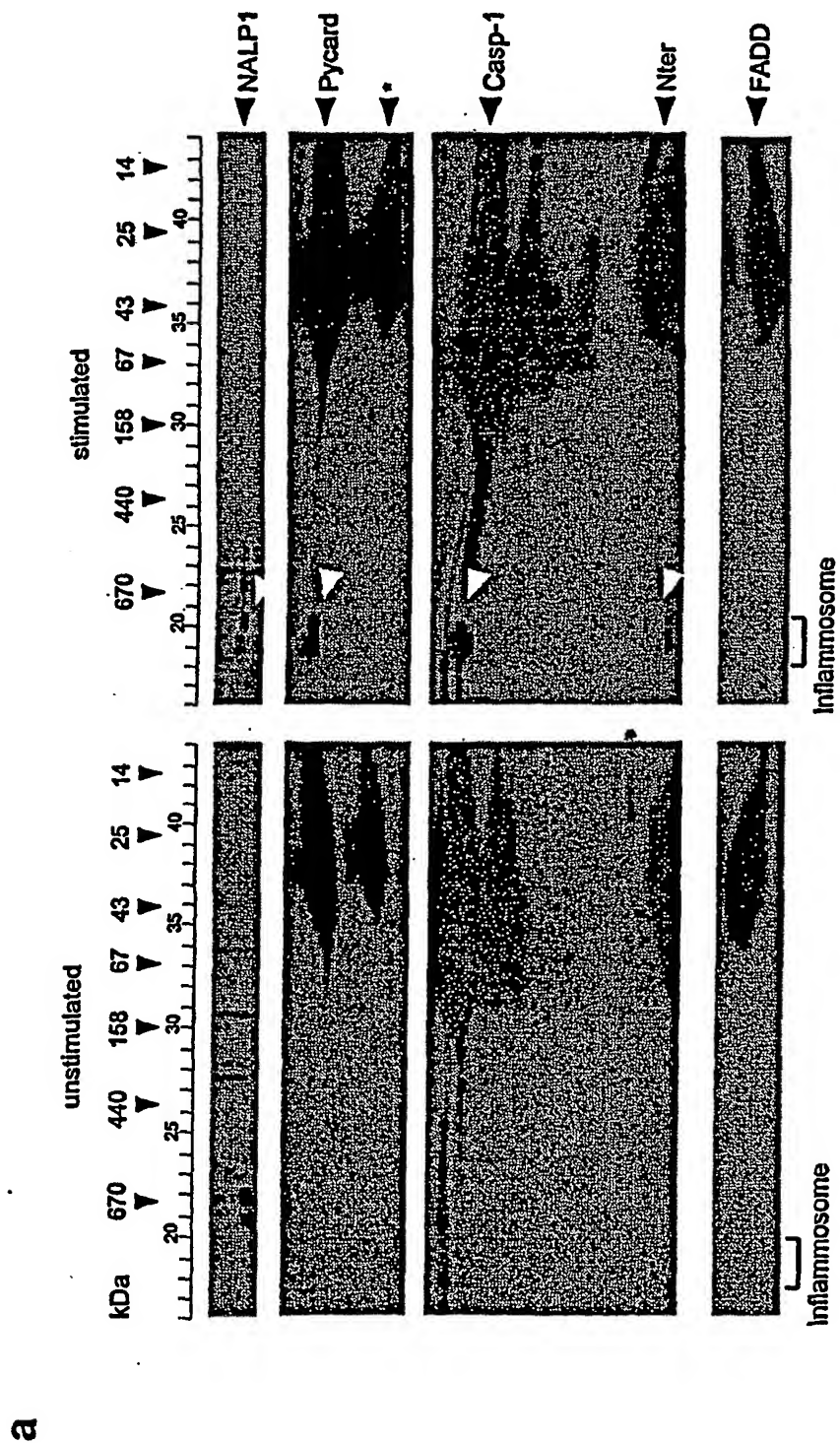
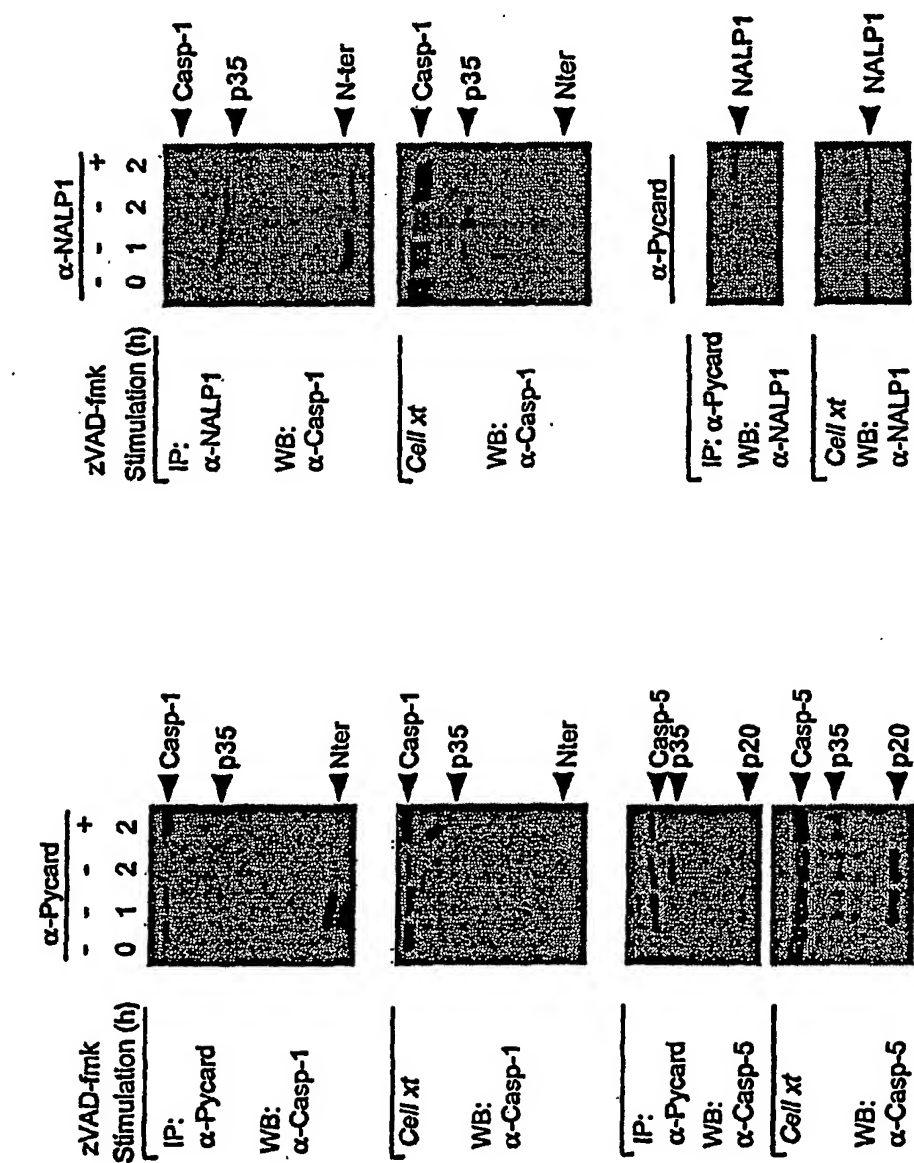


Fig. 12



Forts. Fig. 12

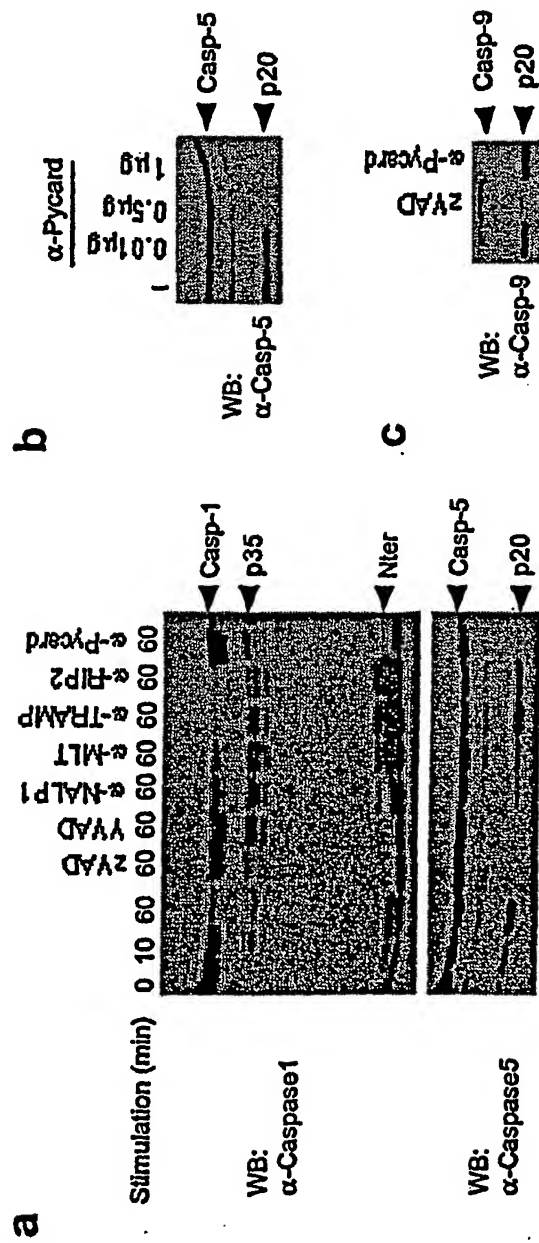


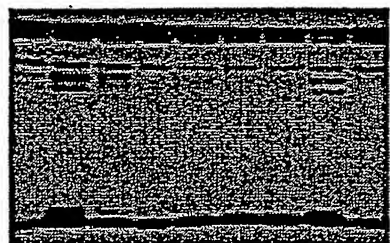
Fig. 13

Forts. Fig. 13

d

Immunodepletion:	α -control	α -Pycard	α -NALP1						
Stimulation (40 min):	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Cytochrome c	-	-	+	-	-	+	-	-	+

WB:
 α - Caspase1



◀ Casp-1
◀ p35

WB:
 α - Caspase9



◀ Casp-9
◀ p20

WB:
 α - Pycard



◀ Pycard

WB:
 α - NALP1



◀ NALP1

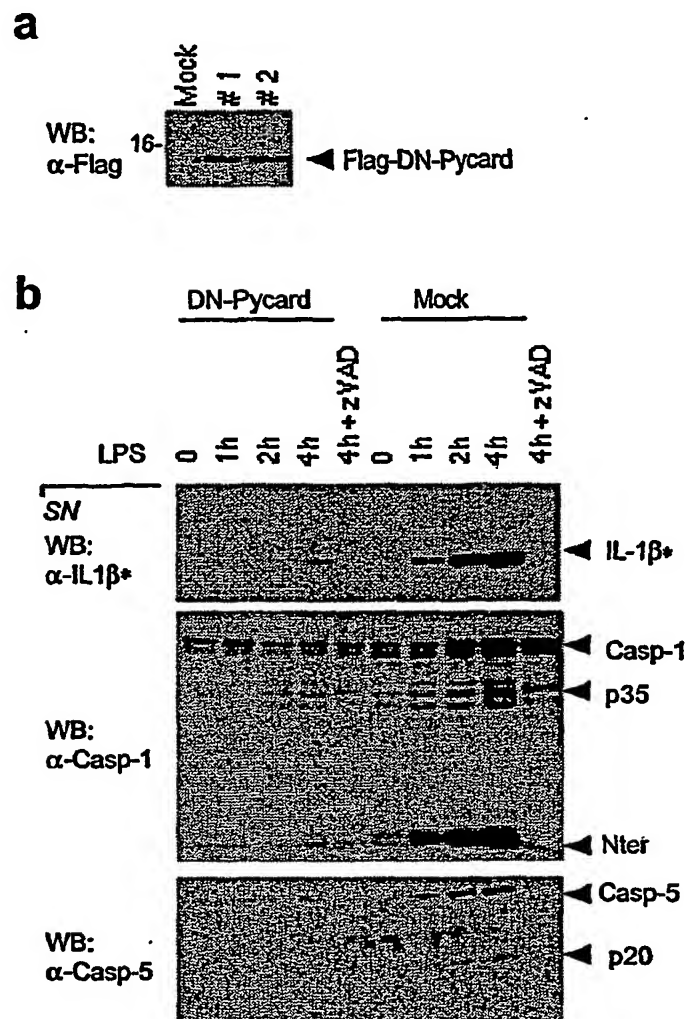


Fig. 14

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/040668 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12, (72) Erfinder; und
C07K 14/47, 16/18, A61K 48/00, 38/17 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TSCHOPP, Jürg
[CH/CH]; 10, ch. des Fontannins, CH-1066 Epalinges
(CH). MARTINON, Fabio [IT/IT]; Valentin 30, CH-1004
Lausanne (CH).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12545
- (22) Internationales Anmeldedatum:
30. Oktober 2001 (30.10.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 56 687.1 15. November 2000 (15.11.2000) DE
100 59 595.2 30. November 2000 (30.11.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): APOXIS SA [CH/CH]; 22, chemin des Croisettes,
CH-1066 Epalinges (CH).
- (74) Anwälte: GRAF VON STOSCH, Andreas usw.; Bosch,
Graf von Stosch, Jehle, Theatinerstrasse 8, 80333 München
(DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

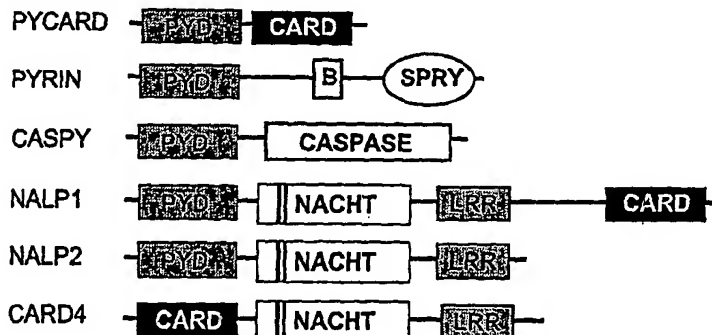
(54) Title: PROTEINS AND DNA SEQUENCES UNDERLYING THESE PROTEINS USED FOR TREATING INFLAMMA-
TIONS

(54) Bezeichnung: PROTEINE UND DEN PROTEINEN ZUGRUNDELIEGENDE DNA-SEQUENZEN MIT FUNKTION BEI
ENTZÜNDUNGSEREIGNISSEN

A

```
Pycard HS 12 LEETFAELKFKMLSLVPT...EGYGRIPGALLSD...ADLDLVLVELEET...ANDL...VLE...GL...NGO...Q...:89
Pyrin HS 13 EEVYVYKPKPK...ONTSE...CHES...R...S...H...A...F...H...L...V...Y...G...E...P...A...V...Q...L...T...V...L...R...N...Q...R...L...A...E...S...H...E...R...A...:90
NALP1 HS 11 EE...K...K...E...L...D...E...O...L...T...K...A...H...S...S...S...G...E...T...C...A...Q...E...K...T...S...G......S...S...T...V...A...Q...Y...G...E...S...A...W...D...L...A...D...H...T...W...E...C...G...L...R...S...C...A...Q...A...Q...E...A...:90
NALP2 HS 13 EE...S...C...E...L...S...K...E...K...Y...L...T...T...F...S...A...S...E...L...Q...S...P...K...E...K...E...T...A...D...G...I...G...L...V...S...T...H...R...C...O...S...T...V...E...H...A...S...L...A...V...F...E...K...A...R...M...D...S...E...R...A...K...E...V...:90
CaspY DR 13 US...C...A...D...L...S...T...D...S...D......R...D...P...R...S...T...R...O...T...D...E...D...L...V...D...L...V...N...T...S...D...A...V...S...T...D...L...R...E...C...H...A...S...E...L...L...N...T...:87
Pycard DR 13 EE...C...A...D...L...S...T...D...S...D......R...D...P...R...S...T...R...O...T...D...E...D...L...V...D...L...V...N...T...S...D...A...V...S...T...D...L...R...E...C...H...A...S...E...L...L...N...T...:88
consensus 1;*****j*****:80
```

B



(57) Abstract: The invention relates to DNA sequences, which code for at least one PYD domain, to expression vectors, which contain DNA sequences of this type, to host cells, which are transformed using expression vectors of this type, to purified gene products of said DNA sequences, to antibodies directed against said gene products, and to methods for isolating and/or expressing said gene products. The invention also relates to the use of said DNA sequences or of their gene products for treating inflammations.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/040668 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:** 3. Juli 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für mindestens eine PYD-Domäne codieren, Expressionsvektoren, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, Wirtszellen, die mit derartigen Expressionsvektoren transformiert sind, aufgereinigte Genprodukte der vorgenannten DNA-Sequenzen, Antikörper gegen für vorgenannten Genprodukte, sowie Verfahren zur Isolierung und/oder zur Expression der vorgenannten Genprodukte. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der vorgenannten DNA-Sequenzen oder von deren Genprodukten zur Behandlung von Entzündungsereignissen.